



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA
PLACA DENTAL DE PACIENTES JOVENS COM HISTÓRICO DE INFARTO
AGUDO DO MIOCÁRDIO: FREQUÊNCIA E RELAÇÃO COM O RISCO
CARDIOVASCULAR**

FORTALEZA

2020

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA PLACA DENTAL DE PACIENTES JOVENS COM HISTÓRICO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: FREQUÊNCIA E RELAÇÃO COM O RISCO CARDIOVASCULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Biofilmes de patógenos orais.

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R573c Rocha, Francisco Ruliglésio.
Caracterização genotípica de *Streptococcus mutans* isolados da placa dental de pacientes jovens com histórico de infarto agudo do miocárdio : frequência e relação com o risco cardiovascular / Francisco Ruliglésio Rocha. – 2020.
87 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.
1. Biofilmes. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Cárie dentária. 4. Cardiopatias. 5. *Streptococcus mutans*.
I. Título.

CDD 616.9

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DA PLACA DENTAL DE PACIENTES JOVENS COM HISTÓRICO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: FREQUÊNCIA E RELAÇÃO COM O RISCO CARDIOVASCULAR.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Biofilmes de patógenos orais.

Aprovada em: 04 / 12 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Simone Duarte
Indiana University (E.U.A.)

Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará (UFC-Sobral)

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Socorro e Riodan.

Ao meu amor, Hermenegilda Izalta Diniz, pelo apoio, paciência e compreensão.

Ao meu filho, João Victor Diniz Rocha.

Aos meus irmãos, Glesiana, Bruno, Roberta e Bárbara.

Aos meus sobrinhos, Lucas e Luís.

Ao meu cunhado, Luciano.

Às minhas amigas, Francitonha e Lucinha.

Aos meus avós maternos, Alaíde e José Jucá (*in memoriam*).

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Reitor Prof. Dr. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque, pela concessão da minha redução de carga horária e afastamento para a realização deste curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro e aos professores do curso que contribuíram com a minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Lidiany Karla Rodrigues Azevedo Gerage pela orientação, confiança, amizade, incentivo, dedicação, competência e exemplo de amor à docência.

À Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, vice-coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica.

Às professoras do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves e Dra. Raquel Carvalho Montenegro, pela permissão de uso das amostras de placa dental com as novas análises.

À médica do Hospital de Messejana, Rochelle Pinheiro Ribeiro, pelo acompanhamento ambulatorial dos pacientes infartados.

Ao Prof. Dr. Kazuhiko Nakano, da Universidade de Osaka, Japão, pela doação das cepas controle.

Às professoras da FFOE, Dra. Renata de Sousa Alves e Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, pelo auxílio na realização dos exames sorológicos no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Ao professor da FFOE, Dr. Tiago Lima Sampaio, pela análise estatística e orientação na interpretação dos resultados.

À professora do Curso de Odontologia da UFC Sobral, Dra. Virgínia Régia Souza da Silveira, pelo auxílio na realização do protocolo de eletroforese.

Ao cirurgião-dentista, João Eudes Teixeira Pinho Filho, pela avaliação clínica e coleta das amostras de placa dental dos participantes do estudo.

A todos os voluntários da pesquisa representados pelos servidores da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação: Antônio Marques da Silva, Waltenúcia Maia Ferreira e Lucivaldo de Sousa Pereira.

Às servidoras do NPDM, Luína Benevides Lima e Laís Lacerda Brasil de Oliveira, pelo suporte na coleta dos exames sorológicos.

À doutoranda do PPGO, Wanessa Fernandes Matias Régis, pela parceria na pesquisa e na execução da parte experimental deste trabalho.

Aos servidores do PPGO, Antônia Karine Barros Nojosa e Manoel Florindo Junior, pelo auxílio nos experimentos realizados no Laboratório de Pesquisa de Microbiologia Oral.

Aos servidores da FFOE, Dr. Ederson Laurindo Holanda de Sousa e Glautemberg de Almeida Viana, pelo auxílio nos experimentos realizados no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas.

À secretária do PPGMM, Carolinda Vilma Soares de Oliveira, pelo apoio administrativo e psicológico durante a realização deste curso.

À amiga Maria de Oliveira Marques da Silva, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio e incentivo para a realização deste curso.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente os voluntários doadores das amostras. Gratidão pela contribuição ao meu trabalho e à ciência!

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima!” (Desconhecido).

RESUMO

A bactéria *Streptococcus mutans* é amplamente associada à cárie dentária e é classificada em quatro sorotipos clínicos (*c*, *e*, *f* e *k*). Os sorotipos raros (*e*, *f* e *k*), múltiplos sorotipos e seus genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) têm sido associados a doenças cardiovasculares. No entanto a prevalência de *S. mutans*, os sorotipos e os genes de proteínas de ligação ao colágeno, bem como sua relação com a cárie dentária e o infarto agudo do miocárdio (IAM), não eram conhecidos no Brasil. O presente estudo investigou a prevalência de *S. mutans*, sorotipos, genes *cnm* e *cbm* em placa dental e sua relação com a cárie dentária e o IAM de 31 pacientes adultos infartados antes dos 50 anos de idade, tendo 17 voluntários sem histórico de doença cardíaca como controle. A avaliação da presença e severidade de lesões de cárie foi realizada usando o Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS). Os perfis lipídicos e glicêmicos foram determinados em soro por métodos enzimáticos colorimétricos. Um total de 5-15 isolados com morfologia de *S. mutans* foram obtidos de cada amostra de placa dental em meio de cultura ágar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB). O DNA das amostras de placa dental e dos isolados bacterianos foi extraído e analisado para identificação de *S. mutans* pela técnica da PCR. As amostras positivas foram analisadas para determinação dos sorotipos e identificação dos genes *cnm* e *cbm*. Verificou-se que *S. mutans* foi identificado em 22,6% (7/31) e 11,8% (2/17) das amostras analisadas dos infartados e controles, respectivamente. A sorotipagem das amostras de placa dental e dos isolados bacterianos dos pacientes infartados portadores de *S. mutans* mostrou que o sorotipo *c* foi o mais prevalente (57,1%; 4/7), seguido pelo *e* (42,9%; 3/7) e *k* (14,3%; 1/7). Somente o sorotipo *c* foi identificado nas amostras do grupo controle (100%; 2/2). Sorotipos raros (*e* ou *k*) e múltiplos sorotipos (*c* e *k*) foram identificados somente nos pacientes infartados. Os genes *cnm* e *cbm* não foram encontrados nas amostras analisadas. A presença de *S. mutans*, independente do sorotipo, não foi associada à cárie dentária nos infartados ($p = 0,853$) e controles ($p = 0,787$). Análise de regressão mostrou que os indivíduos com níveis de colesterol abaixo de 190 mg/dL e sem *S. mutans* apresentaram uma probabilidade 47,4% menor de infarto (OR = 0,474; IC95% = 0,956 – 0,992). Este é o primeiro estudo a relatar a prevalência dos sorotipos de *S. mutans* em pacientes cardiopatas no Brasil. A identificação de sorotipos raros nos pacientes infartados, assim como a presença de múltiplos sorotipos na placa dental de um desses pacientes, alerta para necessidade de estudos mais amplos em população em risco para doenças cardiovasculares. Os níveis normais de colesterol em não portadores de *S. mutans* podem estar associados a uma menor probabilidade de infarto.

Palavras-chave: Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Cárie Dentária. Doenças Cardiovasculares. Cardiopatias. Infarto Agudo do Miocárdio.

ABSTRACT

The bacterium *Streptococcus mutans* is widely associated to dental caries and it is classified into four clinical serotypes (*c*, *e*, *f* and *k*). Rare serotypes (*e*, *f* and *k*), multiple serotypes and its collagen-binding protein genes (*cnm* and *cbm*) have been associated to cardiovascular diseases. However the prevalence of *S. mutans*, the serotypes and the collagen-binding protein genes, as well as its relation with dental caries and acute myocardial infarction (AMI), are not known in Brazil. The present study investigated the prevalence of *S. mutans*, serotypes, *cnm* and *cbm* genes in dental plaque and its relation with dental caries and AMI from 31 infarcted adult patients at age before 50 years old, with 17 volunteers without history of heart disease as a control. The assessment of the presence and carious lesion severity was performed using the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). Lipid and glycemic profiles were accessed in serum by colorimetric enzymatic methods. A total of 5-15 isolates with *S. mutans* morphology were obtained from each dental plaque samples in Mitis Salivarius Bacitracin (MSB) agar culture medium. The DNA from dental plaque samples and bacterial isolates was extracted and analyzed for identification of *S. mutans* by the PCR technique. Positive samples were analyzed to determine serotypes and identify *cnm* and *cbm* genes. It was found that *S. mutans* was identified in 22.6% (7/31) and 11.8% (2/17) of the analysed samples from infarcted and controls, respectively. Serotyping of dental plaque samples and bacterial isolates from infarcted patients with *S. mutans* showed that serotype *c* was the most prevalent (57.1%; 4/7), followed by *e* (42.9%; 3/7) and *k* (14.3%; 1/7). Only the serotype *c* was identified in samples from the control group (100%; 2/2). Rare serotypes (*e* or *k*) and multiple serotypes (*c* and *k*) were identified only in infarcted patients. The *cnm* and *cbm* genes were not found in the analyzed samples. The presence of *S. mutans*, regardless of serotype, was not associated to dental caries in infarcted ($p = 0.853$) and controls ($p = 0.787$). Regression analysis showed that individuals with cholesterol levels below 190 mg/dL and without *S. mutans* presented a 47.4% lower probability of infarction (OR = 0.474; 95% CI = 0.956 - 0.992). This is the first study to report the prevalence of *S. mutans* serotypes in cardiac patients in Brazil. The identification of rare serotypes in infarcted patients, as well as the presence of multiple serotypes in the dental plaque of one of these patients, alert to the need for more extensive studies in population at risk for cardiovascular diseases. Normal cholesterol levels in non-carriers of *S. mutans* may be associated with a lower probability of infarction.

Keywords: Biofilms. *Streptococcus mutans*. Dental Caries. Cardiovascular Diseases. Heart Diseases. Acute Myocardial Infarction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os sistemas do <i>quorum-sensing</i> envolvidos na regulação da virulência de <i>S. mutans</i>	27
Figura 2 – A composição química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular dos sorotipos de <i>S. mutans</i>	29
Figura 3 – Os aspectos morfológicos das colônias de <i>S. mutans</i> em ágar Mitis Salivarius Bacitracina	43
Figura 4 – O protocolo para extração de DNA das amostras analisadas	44
Figura 5 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para <i>S. mutans</i>	52
Figura 6 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para o sorotipo <i>c</i>	54
Figura 7 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos pacientes infartados positivos para sorotipo <i>e</i>	55
Figura 8 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental do paciente infartado positivos para sorotipo <i>k</i>	56
Figura 9 – Os resultados da PCR para detecção dos genes <i>cnm</i> e <i>cbm</i> dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para <i>S. mutans</i>	58
Gráfico 1 – A ANCOVA do colesterol sérico e a idade na ocasião do infarto	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – As características fenotípicas para diferenciação dos grupos de estreptococos <i>viridans</i> encontrados em seres humanos	21
Tabela 2 – A classificação da presença e severidade de cárie baseada nos critérios do ICDAS	42
Tabela 3 – A sequência dos primers utilizados nas PCR	45
Tabela 4 – As cepas padrão utilizadas no presente estudo	46
Tabela 5 – A caracterização demográfica da população estudada	49
Tabela 6 – Os fatores de risco apresentados pelos pacientes infartados	50
Tabela 7 – O perfil de saúde bucal da população estudada pelos critérios do ICDAS	50
Tabela 8 – Os perfis glicêmicos e lipídicos da população estudada	51
Tabela 9 – A identificação de <i>S. mutans</i> , sorotipos e genes <i>cnm</i> e <i>cbm</i> das amostras analisadas dos pacientes infartados	51
Tabela 10 – A identificação de <i>S. mutans</i> , sorotipos e genes <i>cnm</i> e <i>cbm</i> das amostras analisadas dos voluntários do grupo controle	53
Tabela 11 – Os fatores de risco, parâmetros bioquímicos, sorotipos, genes <i>cnm</i> e <i>cbm</i> e perfil de cárie dos pacientes infartados portadores de <i>S. mutans</i>	57
Tabela 12 – A relação da presença de <i>S. mutans</i> (independente do sorotipo) com a cárie dentária na população estudada	59
Tabela 13 – A relação da presença dos sorotipos de <i>S. mutans</i> com a cárie em esmalte e dentina nos pacientes infartados.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cbm	<i>Collagen-binding protein of S. mutans</i>
Cnm	<i>Collagen-binding protein of S. mutans</i>
CSP	<i>Competence-Stimulating Peptide</i>
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GBD	<i>Global Burden of Disease Study</i>
GBPs	<i>Glucan-Binding Proteins</i>
Gtfs	<i>Glucosyltransferases</i>
HDL-c	<i>High Density Lipoprotein cholesterol</i>
ICDAS	<i>The International Caries Detection and Assessment System</i>
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein cholesterol</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MSB	<i>Mitis Salivarius Bacitracin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RGP	<i>Rhamnose-Glucose Polymers</i>
RPM	rotações por minuto
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
TCSTS	<i>Two-component signal transduction systems</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
WapA	<i>Cell-Wall-Associated Protein A</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
kb	Quilobase
α	Alfa
β	Beta
kDa	Quilodalton
~	Aproximadamente
°C	Grau Celsius
μ L	Microlitro
U/ml	Unidades/mililitro
CO ₂	Gás carbônico
mL	Mililitro
ng	Nanograma
μ L	Microlitro
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
<	Menor que
>	Maior que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	A cárie dentária	20
2.1.1	<i>Os grupos de estreptococos viridans e o papel de S. mutans na cárie dentária</i>	20
2.1.2	<i>O papel das glucosiltransferases de S. mutans na cárie dentária</i>	22
2.1.3	<i>O papel das proteínas de ligação aos glucanos de S. mutans na cárie dentária</i> .	22
2.1.4	<i>Os eventos de desmineralização e remineralização</i>	23
2.2	A heterogeneidade genética e fenotípica de S. mutans	24
2.3	A comunicação célula-célula nos biofilmes de S. mutans	25
2.3.1	<i>Os sistemas de transdução de sinais de dois componentes de S. mutans</i>	26
2.4	A classificação, prevalência e aspectos relacionados à virulência dos sorotipos de S. mutans	29
2.5	As proteínas de ligação ao colágeno de S. mutans	31
2.5.1	<i>As proteínas de superfície celular (PA) e parede celular (WapA)</i>	31
2.5.2	<i>As proteínas de ligação ao colágeno Cnm e Cbm</i>	32
2.6	A relação das proteínas de ligação ao colágeno Cnm e Cbm com a cárie dentária e doenças sistêmicas	33
2.6.1	<i>A relação das proteínas Cnm e Cbm com a cárie dentária</i>	33
2.6.2	<i>A relação das proteínas Cnm e Cbm com a endocardite infecciosa</i>	33
2.6.3	<i>A relação das proteínas Cnm e Cbm com a hemorragia cerebral e outras doenças sistêmicas</i>	36
2.7	A relação de S. mutans com a aterosclerose e o IAM	37
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	O delineamento do estudo	41
4.2	As coletas das amostras de placa dental	41
4.3	A ativação das amostras de placa dental e a obtenção dos isolados bacterianos da placa dental	43

4.4	A extração de DNA dos isolados bacterianos e das amostras de placa dental	44
4.5	As reações em cadeia da polimerase (PCR)	45
4.5.1	<i>A identificação de S. mutans das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental</i>	46
4.5.2	<i>A determinação dos sorotipos de S. mutans das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental</i>	47
4.5.3	<i>A identificação dos genes <i>cnm</i> e <i>cbm</i> das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental</i>	47
4.6	A análise estatística	48
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	79
	ANEXO B – CADASTRO NO SISGEN	82
	ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS	83
	ANEXO D – TERMO DE DOAÇÃO DAS CEPAS CONTROLE	85
	ANEXO E – PERMISSÃO DE REPUBLICAÇÃO DA FIGURA 2	87

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga mais de 700 espécies de bactérias que colonizam as superfícies dos dentes e os tecidos moles da mucosa oral (KILIAN *et al.*, 2016). Neste contexto, *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e fermentadora de açúcares, é um microrganismo amplamente associado à cárie dentária (LOESCHE, 1986; PITTS *et al.*, 2017) e, ocasionalmente, implicado na patogênese da aterosclerose (NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014), endocardite infecciosa (NOMURA *et al.*, 2012b; OTSUGU *et al.*, 2017) e acidente vascular cerebral (NAKANO *et al.*, 2011; INENAGA *et al.*, 2018).

As cepas de *S. mutans* são classificadas em quatro sorotipos clínicos: *c*, *e*, *f* e *k* (NAKANO; OOSHIMA, 2009). A classificação sorológica de *S. mutans* baseia-se na estrutura química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular bacteriana, com aproximadamente 75-80% das cepas encontradas na cavidade oral classificadas como sorotipo *c*, seguido pelos *e* (20%), *f* (5%) e *k* (2-5%) (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009).

Os genes *cnm* e *cbm* representam dois dos genes não essenciais identificados em *S. mutans* e que codificam as proteínas de superfície celular de ligação ao colágeno Cnm e Cbm, respectivamente (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.*, 2012a). As frequências de distribuição de cepas de *S. mutans* positivas para *cnm* e *cbm* foram de aproximadamente 10% e 2% nos isolados orais de indivíduos saudáveis (NOMURA *et al.*, 2009; NOMURA *et al.*, 2012a). Além disso os genes *cnm* e *cbm* foram identificados em maior frequência nos sorotipos menos prevalentes (*e*, *f* e *k*) (NAKANO; OOSHIMA, 2009; NOMURA *et al.*, 2012a).

A partir da metabolização dos açúcares da dieta, especialmente a sacarose, *S. mutans* é capaz de sintetizar polissacarídeos extracelulares e intracelulares, principalmente glucanos insolúveis e solúveis (MARSH, 2006; BOWEN; KOO, 2011). Os glucanos insolúveis, sintetizados pela ação das glucosiltransferases (Gtfs), são vitais para adesão de microrganismos ao esmalte dentário e estabelecimento de um biofilme cariogênico que restringe a saída de ácidos orgânicos e a entrada de saliva para o tamponamento do pH do fluido do biofilme na interface dente-biofilme, criando microambientes ácidos que são essenciais para a patogênese da cárie dentária (BOWEN; KOO, 2011; KLEIN *et al.*, 2015). O aprisionamento dos ácidos orgânicos no biofilme cariogênico promove a dissolução dos minerais dentários, principalmente o cálcio e o fósforo do cristal de hidroxiapatita do esmalte dentário, podendo resultar em sua desmineralização e formação de lesões de cárie (MARSH, 2006; PITTS *et al.*, 2017). Além disso a acidificação da matriz do biofilme potencializa a seleção de uma microbiota acidogênica

e acidúrica mais cariogênica (MARSH, 2006; PITTS *et al.*, 2017) causando uma disbiose oral e levando ao aparecimento de lesões de cárie.

Os substratos ricos em colágeno, como a dentina, podem ser acessados em razão de lesões de cárie avançadas. A exposição desses tecidos, por conseguinte, representa um alvo em potencial para colonização e persistência de cepas que expressam proteínas de ligação ao colágeno (HO *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2020). Neste sentido, estudos clínicos sugeriram uma associação entre a presença de cepas de *S. mutans* positivas para os genes *cnm* e/ou *cbm* e o aumento do risco e severidade de cárie (NOMURA *et al.*, 2009; MISAKI *et al.*, 2016; ESBERG *et al.*, 2017; LAMBA *et al.*, 2020). Além disso procedimentos odontológicos, como extrações, cirurgias e os cuidados diários de higiene bucal, como a escovação e o uso de fio dental, podem representar possíveis portas para entrada e disseminação de *S. mutans* na corrente sanguínea levando à ocorrência de bacteremia transitória que representa a primeira etapa na patogênese de doenças sistêmicas causadas por bactérias orais (SEYMOUR *et al.*, 2000). Cepas pertencentes aos sorotipos menos prevalentes (*e*, *f* e *k*) e portadoras dos genes *cnm* e/ou *cbm*, de fato, foram encontradas em amostras de placas de ateroma e valvas cardíacas de pacientes japoneses (NAKANO *et al.*, 2007; NOMURA *et al.*, 2012b). O DNA de *S. mutans*, adicionalmente, foi identificado em 100% das amostras orais (saliva, placa supragengival e subgengival) e placas ateroscleróticas coletadas de pacientes adultos com doença cardiovascular no Ceará, Brasil (FERNANDES *et al.*, 2014).

Portanto as pesquisas clínicas e laboratoriais com sorotipos de *S. mutans* (*c*, *e*, *f* e *k*) positivos para os genes *cnm* e/ou *cbm*, além de sugerirem um potencial envolvimento dessas cepas no aumento do risco e severidade de cárie, também apontaram para sua associação à etiopatogênese da doença arterial coronariana aterosclerótica (NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014), endocardite infecciosa (NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2014; OTSUGU *et al.*, 2017) e acidente vascular cerebral (NAKANO *et al.*, 2011; INENAGA *et al.*, 2018). No Brasil, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, incluindo o infarto agudo do miocárdio (IAM), encontra-se entre as maiores do mundo (183,3 por 100 mil habitantes) (SANTOS *et al.*, 2018). A identificação e caracterização desses sorotipos representam, portanto, uma oportunidade de ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de adesão, invasão e progressão de doenças, além de revelar possíveis alvos que podem ser explorados no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *S. mutans* (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016; MICHAEL *et al.*, 2018).

Diversos países têm conduzido pesquisas para determinar a prevalência dos

sorotipos de *S. mutans* e seus genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) (NAKANO *et al.*, 2007; NOMURA *et al.*, 2012a; SWEDAN; OBEIDAT; SHAKHATREH, 2018; MOMENI *et al.*, 2019; ROSERO *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020). Os dados de prevalência desses sorotipos e seus fatores de virulência, no entanto, ainda são raros no Brasil, justificando a importância de elucidar a prevalência dos sorotipos de *S. mutans* e seus genes *cnm* e *cbm* em uma população adulta acometida por IAM antes dos 50 anos de idade e em voluntários sem histórico de doença cardíaca para identificar sujeitos portadores de cepas que podem aumentar o risco de doenças orais e sistêmicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cárie dentária

A cárie dentária é uma doença que depende do acúmulo de um biofilme complexo na superfície do dente e da sua frequente exposição aos carboidratos fermentáveis da dieta, principalmente a sacarose, aliada a uma higiene bucal deficiente (FEJERSKOV, 2004; PITTS *et al.*, 2017). O biofilme dentário, ou placa dental, é uma associação de microrganismos aderidos às superfícies dentárias e protegidos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (FLEMMING *et al.*, 2016; BOWEN *et al.*, 2018). Embora a prevalência global padronizada por idade e a incidência de cárie não tratada em dentes permanentes tenham permanecido estáveis ao longo dos últimos anos (1990 - 2015), dados do estudo de Carga Global de Doenças (GBD, 2015) mostraram que a cárie foi a condição mais prevalente (34,1%) em todo o mundo afetando 2,5 bilhões de pessoas (KASSEBAUM *et al.*, 2017).

2.1.1 Os grupos de estreptococos *viridans* e o papel de *S. mutans* na cárie dentária

Os estreptococos constituem um gênero de bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas e são caracterizados pela morfologia que varia de dois a muitos cocos em cadeia ao exame microscópico (ZHOU; LI, 2015). Na bacteriologia clínica, os estreptococos são divididos em três categorias com base em sua capacidade de induzir hemólise: α -hemolítico, β -hemolítico e γ -hemolítico (ou não hemolítico) (ZHOU; LI, 2015). Os grupos de estreptococos *viridans* incluem várias espécies de estreptococos α -hemolíticos e γ -hemolíticos sendo que a maioria faz parte da microbiota normal do trato respiratório superior e geniturinário (PROCOP *et al.*, 2017).

Os grupos de estreptococos *viridans* incluem o grupo mutans, o mitis/sanguinis, o salivarius, o anginosus e o bovis (DOERN; BURNHAM, 2010). Os microrganismos podem ser classificados nesses grupos com base na produção de arginina di-hidrolase (ADH), hidrólise da esculina (ESC), produção de acetoína na prova de Voges-Proskauer (VP), produção de ácidos a partir da fermentação de manitol (MNTL) e sorbitol (SORB) e produção de urease (URE) (Tabela 1).

Tabela 1 – As características fenotípicas para diferenciação dos grupos de estreptococos *viridans* encontrados em seres humanos

Grupo	ADH	ESC	VP	Produção de ácidos a partir de		URE	Espécies
				MNTL	SORB		
Grupo mutans	-	+	+	+	+	-	<i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus cristatus</i> , <i>Streptococcus peroris</i> , <i>Streptococcus infantis</i> , <i>Streptococcus australis</i> , <i>Streptococcus oligofermentans</i> e <i>Streptococcus sinensis</i> (VP ⁺).
Grupo mitis/ sanguinis	V	V	-	-	-	-	<i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus vestibularis</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> e <i>Streptococcus alactolyticus</i> .
Grupo salivarius	-	V	+	-	-	V	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> e <i>Streptococcus intermedius</i> .
Grupo anginosus	+	+	+	-	-	-	<i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus equinus</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i> e <i>Streptococcus infantarius</i> .
Grupo bovis	-	+	+	V	-	-	

Fonte: PROCOP *et al.* (2017, com adaptações).

+ = reação positiva; - = reação negativa; V = reação variável; ADH = arginina di-hidrolase; ESC = hidrólise da esculina; VP = Voges-Proskauer (acetoína); MNTL = manitol; SORB = sorbitol; URE = urease.

Na cavidade oral, *S. mutans* é a bactéria mais amplamente associada à cárie dentária (LOESCHE, 1986; BOWEN; KOO, 2011; PITTS *et al.*, 2017). Esse microrganismo foi descrito no início do século XX quando o pesquisador James Kilian Clarke o isolou de lesões de cárie (CLARKE, 1924). No entanto somente na década de 1960 é que essa bactéria começou a ser amplamente estudada devido aos seus fatores de virulência para cárie dentária quando foi reconhecida como um microrganismo cariogênico (LOESCHE, 1986).

As principais características de virulência de *S. mutans* incluem: (i) a capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade) a partir da metabolização de carboidratos; (ii) a capacidade de sobreviver em pH baixo (aciduricidade) e (iii) a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares e intracelulares a partir da

metabolização dos açúcares da dieta, principalmente a sacarose, que desempenham um papel crítico na adesão inicial, colonização e acúmulo de biofilmes cariogênicos nas superfícies dentárias (MARSH, 2006; BOWEN; KOO, 2011).

2.1.2 O papel das glucosiltransferases de *S. mutans* na cárie dentária

Os polissacarídeos que compõem a matriz do biofilme cariogênico são principalmente os glucanos, sintetizados pelas Gtfs aderidas à película salivar do esmalte dentário e/ou à superfície de outros microrganismos, que são essenciais para a adesão de microrganismos aos dentes e o estabelecimento de uma matriz mecanicamente estável que aumenta a adesão célula-célula, limita a difusão de metabólitos e protege as células nela embebidas promovendo a criação de microambientes altamente ácidos e cruciais para a patogênese da cárie dentária (BOWEN; KOO, 2011; KLEIN *et al.*, 2015).

S. mutans produz ao menos três tipos de Gtfs: GtfB, GtfC e GtfD, que são sintetizadas pelos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*, respectivamente (BOWEN; KOO, 2011). A GtfB sintetiza principalmente glucanos insolúveis em água com predomínio de ligações glicosídicas α -1,3 (AOKI *et al.*, 1986); a GtfC produz uma mistura de glucanos solúveis com predomínio de ligações glicosídicas α -1,6 e insolúveis (ligações glicosídicas α -1,3) (HANADA; KURAMITSU, 1988) e a GtfD sintetiza predominantemente glucanos solúveis (ligações glicosídicas α -1,6) que servem como reserva de energia para as células (HANADA; KURAMITSU, 1989).

As Gtfs são constituídas por dois domínios funcionais: (i) um domínio catalítico amino-terminal que se liga ao substrato e o hidrolisa e (ii) um domínio carboxil-terminal que determina a natureza do glucano sintetizado (MATSUMOTO-NAKANO, 2018). No geral, todas as Gtfs exibem um papel importante na formação de um biofilme cariogênico, uma vez que participam da síntese de uma variedade de glucanos com estruturas e funções distintas (BOWEN; KOO, 2011). Vale ressaltar que a construção de uma matriz insolúvel rica em polissacarídeos é uma característica de virulência que ajuda na diferenciação de *S. mutans* de outras espécies acidogênicas e acidúricas (KLEIN *et al.*, 2015).

2.1.3 O papel das proteínas de ligação aos glucanos de *S. mutans* na cárie dentária

A síntese de glucanos pelas Gtfs, especialmente GtfB e GtfC, potencializa a adesão de novas células de *S. mutans* ao substrato colonizado pela ação das proteínas de ligação aos

glucanos (GBPs) presentes na superfície da bactéria aumentando o biovolume do biofilme (BOWEN; KOO, 2011).

S. mutans produz pelo menos quatro tipos de GBPs: GbpA (RUSSELL; COLEMAN; DOUGAN, 1985), GbpB (SMITH *et al.*, 1994), GbpC (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 1997) e GbpD (SHAH; RUSSELL, 2004). A GbpA está envolvida na adesão celular às superfícies dentárias contribuindo para cariogenicidade de *S. mutans* (MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2007). A deficiência de GbpA causou a diminuição da eficiência de ligação à matriz de substâncias poliméricas extracelulares e resultou na formação de um biofilme irregular e frágil comprovando a importância da GbpA na construção de um biofilme firme e estável (MATSUMOTO-NAKANO, 2018). As proteínas GbpC e, possivelmente, GbpB estão ligadas à parede celular e podem funcionar como receptores de glucanos da superfície celular em *S. mutans* (BANAS; VICKERMAN, 2003). A GbpD contribui para coesão e adesão de células microbianas à superfície dos dentes via dextranos (SHAH; RUSSELL, 2004).

2.1.4 Os eventos de desmineralização e remineralização

A cárie dentária é caracterizada pela dissolução dos minerais dentários ocasionada pelos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias presentes no biofilme a partir do metabolismo dos carboidratos fermentáveis da dieta, como a sacarose, resultando na destruição dos tecidos mineralizados dos dentes (MARSH, 2006; PITTS *et al.*, 2017). Para a cárie dentinária e radicular, a clivagem do colágeno por enzimas bacterianas ou dentinárias acontece após a perda mineral inicial e contribui para a perda do tecido duro dentário (TAKAHASHI; NYVAD, 2016). Além disso a acidificação do biofilme promove a seleção de uma microbiota acidogênica e acidúrica (MARSH, 2006; PITTS *et al.*, 2017), causando uma disbiose oral e afetando a homeostase do ambiente. Assim a cada nova ingestão de açúcar, os ácidos produzidos pelas bactérias presentes no biofilme, p.ex. o ácido lático, acumulam-se e, logo, tem-se uma redução do pH do fluido do biofilme em contato com o substrato dental (CURY *et al.*, 2016).

A perda da estrutura mineral do dente, especialmente o cálcio e o fosfato do cristal da hidroxiapatita, ocorre quando o pH do fluido em contato com a dentina e o esmalte encontra-se abaixo de 6,5 e 5,5, respectivamente (desmineralização) (CURY *et al.*, 2016). Após 20-30 minutos da ingestão, os açúcares são eliminados da boca por deglutição e diluição salivar resultando no retorno do pH do fluido à neutralidade, quando, acima de 5,5 para o esmalte e 6,5 para dentina, os minerais perdidos são parciais ou totalmente recuperados pela ação

remineralizante da saliva (remineralização) (CURY *et al.*, 2016). O equilíbrio em direção à desmineralização ou remineralização dependerá, portanto, da frequência de ingestão diária de açúcar (CURY *et al.*, 2016). Contudo caso ocorra um desequilíbrio favorável à desmineralização, a perda de minerais acentua-se podendo resultar na formação de lesões de cárie em esmalte e dentina (PITTS *et al.*, 2017). Neste contexto, a remoção mecânica do biofilme, a restrição à ingestão de açúcares e a adoção de terapias com fluoreto são primordiais para a manutenção da higidez dos dentes (CURY *et al.*, 2016).

2.2 A heterogeneidade genética e fenotípica de *S. mutans*

O genoma completo de uma cepa de *S. mutans* (cepa UA159, sorotipo *c*) foi publicado em 2002 por pesquisadores do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Oklahoma (*University of Oklahoma*, Norman, E.U.A.) (AJDIĆ *et al.*, 2002). O sequenciamento revelou que o genoma da cepa citada é organizado em único cromossomo circular de aproximadamente 2.03 milhões de pares de bases contendo baixo conteúdo de guanina e citosina (38,82%). O genoma da cepa UA159 (ATCC® 700610™) está depositado no banco de dados *GenBank* do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) com o identificador de acesso AE014133.

Nos anos seguintes, com a popularização das tecnologias de sequenciamento de nova geração, com capacidade aumentada de geração de dados e melhor custo-benefício, os genomas de dezenas de cepas de *S. mutans* foram sequenciados e depositados em bancos de dados públicos, como o NCBI. A publicação de múltiplas sequências genômicas de uma mesma espécie resultou no conceito de pangenoma que é a soma dos genes presentes em todas as linhagens de uma mesma espécie (*core genoma*), os quais estão relacionados a funções biológicas básicas e propriedades fenotípicas do microrganismo, e dos presentes apenas em algumas linhagens de uma mesma espécie (*dispensable genome*), os quais contribuem para diversidade, adaptação, resistência e virulência (TETTELIN *et al.*, 2005; MENG *et al.*, 2017). Essas variações intraespécie podem ocorrer devido à redução do genoma, rearranjos do genoma, duplicação de genes e aquisição de novos genes por meio de transferência lateral (FRASER-LIGGETT, 2005).

Um dos primeiros estudos de genômica comparativa baseado no sequenciamento *shotgun* de 57 isolados clínicos, coletados em diferentes países, concluiu que o pangenoma de *S. mutans* é composto de 3.296 genes e o *core genoma* de 1.490 genes, sendo que 73 genes do *core genoma* foram identificados em todos os isolados de *S. mutans* (*unique genome*)

sequenciados, porém não foram encontrados em outras espécies do grupo mutans, muitos dos quais estão envolvidos no metabolismo dos carboidratos, adesão e resistência ácida (CORNEJO *et al.*, 2013). Assim o conhecimento de que muitos genes não essenciais (*dispensable genome*) podem ser encontrados em *S. mutans* ressalta as limitações do uso de apenas uma sequência genômica como referência para estudos de genômica funcional e reforça o potencial adaptativo dessa espécie para sobrevivência na cavidade oral (PALMER *et al.*, 2013). O mesmo estudo, usando análise demográfica populacional baseada em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do *core genome*, sugeriu que um grande processo de expansão populacional de *S. mutans* ocorreu entre 3.000 e 10.000 anos atrás coincidindo com o início das práticas de agricultura e o aumento da quantidade e diversidade de carboidratos consumidos pelo hospedeiro humano (CORNEJO *et al.*, 2013).

Em outro estudo, um alto grau de variabilidade nos fenótipos intrinsecamente relacionados à virulência, incluindo a habilidade para formar biofilme na presença de sacarose, tolerar o pH ácido e a tensão oxidativa, foi observado em 15 dos isolados geneticamente mais diversos entre as 57 cepas sequenciadas no estudo anterior (PALMER *et al.*, 2013), sugerindo que nem todas as cepas de *S. mutans* apresentam o mesmo potencial de virulência e, assim, fornecendo uma explicação do motivo pelo qual as tentativas de correlacionar certos genótipos de *S. mutans* com a incidência de cárie mostraram-se uma abordagem complexa (LEMBO *et al.*, 2007; PHATTARATARATIP *et al.*, 2011; ARGIMÓN *et al.*, 2014; LEMOS *et al.*, 2019).

2.3 A comunicação célula-célula nos biofilmes de *S. mutans*

No modo de crescimento em biofilme, os microrganismos naturalmente alteram os seus padrões de expressão gênica para desativar genes imperativos ao modo de vida planctônico e ativar os necessários ao estilo de vida em uma superfície biótica ou abiótica (MARSH, 2006). Além disso um sistema de comunicação célula-célula, chamado de *quorum sensing* (QS), permite que os microrganismos no biofilme detectem e respondam aos estresses ambientais, como escassez ou excesso de nutrientes, baixo pH e presença de antimicrobianos regulando, assim, diversos processos fisiológicos, como formação de biofilmes, tolerância ao estresse ácido e incorporação de DNA exógeno por meio da síntese de moléculas de sinalização que se acumulam no meio com o aumento da densidade populacional e que são detectadas pelas células vizinhas (CVITKOVITCH; LI; ELLEN, 2003; MARSH, 2006). Assim o QS é um processo pelo qual as bactérias interagem umas com outras pela produção, liberação, detecção e resposta a pequenas moléculas autoindutoras para coordenar o seu comportamento coletivo em um modo

dependente da densidade celular (WATERS; BASSLER, 2005). Neste processo, as bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos autoindutores e as Gram-negativas, pequenas moléculas orgânicas, sobretudo as *N-acil homoserina lactonas*. Outrossim as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem o gene *luxS* que participa da síntese do peptídeo autoindutor-2 (AI-2) envolvido na sinalização interespecie (WATERS; BASSLER, 2005).

2.3.1 Os sistemas de transdução de sinais de dois componentes de *S. mutans*

Os sistemas de transdução de sinais de dois componentes (TCSTS) desempenham importantes funções relacionadas à adaptação, sobrevivência e virulência bacteriana pela detecção de mudanças no ambiente e alteração da expressão de conjuntos específicos de genes para montar respostas coordenadas aos estímulos ambientais (LEMOS *et al.*, 2019). No TCSTS, um sinal é detectado e propagado por fosfotransferência da proteína sensora histidina quinase, localizada na superfície celular, para sua proteína reguladora de resposta cognata, localizada no citoplasma, que, por sua vez, liga-se ao DNA alvo para ativar ou reprimir a expressão de genes envolvidos na formação de biofilmes, absorção de nutrientes e tolerância aos diferentes tipos de estresse (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000; LEMOS *et al.*, 2019). O genoma da cepa de *S. mutans* UA159 (sorotipo *c*) codifica 14 desses TCSTS e um regulador de resposta órfão, CovR, sem ligação genética a qualquer histidina quinase (AJDIĆ *et al.*, 2002; SMITH; SPATAFORA, 2012).

Em *S. mutans*, o sistema de dois componentes *comCDE* é reconhecido por regular atividades fisiológicas e fatores associados à virulência. Na via de sinalização mediada pelo operon *comCDE*, o gene *comC* codifica o peptídeo estimulador de competência (CSP); o *comD*, a proteína sensora histidina quinase (ComD) ligada à membrana e o *comE*, a proteína reguladora de resposta cognata (ComE) situada no citoplasma (LI *et al.*, 2001a). Ao ser sintetizado, o CSP (um peptídeo de 21 aminoácidos) é processado e transportado para o meio extracelular por um transportador (ComA) do tipo ABC (ATP-binding cassette) e uma proteína acessória (ComB) (PETERSEN; SCHEIE, 2000). No meio extracelular, o CSP-21 é novamente processado pela protease SepM, localizada na membrana, para gerar o CSP ativo (um peptídeo de 18 aminoácidos) (BISWAS *et al.*, 2016). Em altas concentrações no meio extracelular, o CSP-18 liga-se ao receptor e ativa a histidina quinase (ComD) das células próximas via autofosforilação que, em seguida, promove a ativação da proteína reguladora de resposta cognata (ComE) via fosfotransferência (Figura 1) (SHANKER; FEDERLE, 2017). Ao ser fosforilada, ComE ativa seus genes-alvo e, por conseguinte, uma cascata de sinalização envolvida na formação de

(XIP-*comX*- ou *sigX*-inducing peptide) e transportado de volta para dentro da célula por um sistema de permease para oligopeptídeos (sistema Opp) para formar um complexo com o regulador transcricional ComR e ativar *comS*, resultando em autoindução da via *comRS*, e *comX* (*sigX*) que é responsável pela ativação de genes envolvidos no desenvolvimento de competência genética (Figura 1) (MASHBURN-WARREN; MORRISON; FEDERLE, 2010; SHIELDS; BURNE, 2016).

Em adição *S. mutans* emprega o peptídeo AI-2, um subproduto do metabolismo do ciclo do metil ativado, mediado pela enzima LuxS, na comunicação interespecie (WATERS; BASSLER, 2005). A deficiência de LuxS reduziu a habilidade de *S. mutans* para formar biofilmes e tolerar o estresse ácido e oxidativo (MERRITT *et al.*, 2003; WEN *et al.*, 2011). Em consonância com os fenótipos afetados, a deficiência de LuxS resultou em alterações na expressão de genes envolvidos na formação de biofilmes e tolerância ácida (SZTAJER *et al.*, 2008; WEN *et al.*, 2011). No entanto um receptor específico para o AI-2 ainda não foi identificado (SZTAJER *et al.*, 2008; SZTAJER *et al.*, 2014).

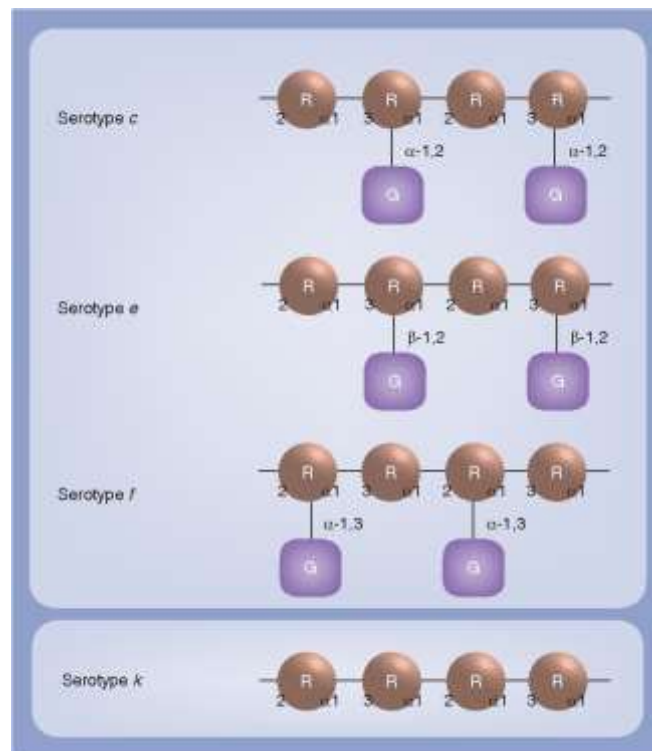
Notavelmente, *S. mutans* é amplamente reconhecido por seu potencial cariogênico. Além disso a literatura tem reportado o possível envolvimento desse microrganismo na etiopatogênese da doença arterial coronariana aterosclerótica (NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014), endocardite infecciosa (NAKANO; NOMURA; OOSHIMA, 2008a; NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2014), acidente vascular cerebral (NAKANO *et al.*, 2011; INENAGA *et al.*, 2018), colite ulcerativa (KOJIMA *et al.*, 2012), esteatose hepática não alcoólica (NAKA *et al.*, 2016) e nefropatia por IgA (ITO *et al.*, 2019).

Uma vez que *S. mutans* dispõe de um sistema de comunicação intraespecie e interespecie para regular os seus atributos de virulência, acredita-se que a adoção de estratégias que impeçam essa comunicação pelo uso de inibidores do QS possa ter ampla aplicabilidade para o controle biológico do agente citado. Uma revisão foi elaborada, assim, durante o doutorado, com o propósito de identificar compostos biológicos com efeitos na inibição da comunicação estabelecida por *S. mutans* e no controle dos seus atributos de virulência (ROCHA *et al.*, 2020) (Anexo C).

2.4 A classificação, prevalência e aspectos relacionados à virulência dos sorotipos de *S. mutans*

A classificação de *S. mutans* em quatro sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) baseia-se na composição química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular que é formado de polímeros de ramnose unidos por ligações do tipo α -1,2 e α -1,3 e cadeias laterais de polímeros de glicose unidas por ligações do tipo α -1,2 (sorotipo *c*), β -1,2 (sorotipo *e*) e α -1,3 (sorotipo *f*) (LINZER; REDDY; LEVINE, 1986; PRITCHARD *et al.*, 1987). No entanto o sorotipo *k* é caracterizado por uma redução drástica na quantidade de cadeias laterais de glicose do polímero de ramnose (NAKANO *et al.*, 2004a) (Figura 2).

Figura 2 – A composição química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular dos sorotipos de *S. mutans*



Fonte: Nakano e Ooshima (2009), com permissão de republicação: n°1013692-1 (Ver Anexo E).

De início, os sorotipos foram determinados usando o método de imunodifusão (BRATTHALL, 1970; NAKANO *et al.*, 2004a). Posteriormente, autores desenvolveram uma abordagem para sorotipagem pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com base na variabilidade entre os genes envolvidos na síntese do polissacarídeo de ramnose-glicose (SHIBATA *et al.*, 2003; NAKANO *et al.*, 2004b). Assim os estudos clínicos baseados nas

técnicas de imunodifusão e PCR mostraram que o sorotipo mais encontrado na cavidade oral é o *c* (70-80%), seguido pelo *e* (20%), enquanto os *f* e *k* são menos prevalentes e, tipicamente, representam cerca de 5% e 2-5% dos isolados orais, respectivamente (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009).

Além da redução drástica na quantidade de cadeias laterais de glicose do polímero de ramnose da parede celular, as cepas do sorotipo *k* costumam apresentar defeitos na expressão de proteínas da superfície celular, como o antígeno proteico (PA), resultando na diminuição da susceptibilidade à fagocitose mediada pelos leucócitos polimorfonucleares tornando-as mais virulentas na infecção sistêmica (NAKANO *et al.*, 2006a; LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009). A detecção dos sorotipos *e* e *k*, de fato, foi significativamente maior em amostras de valvas cardíacas e placas de ateroma coletadas de indivíduos submetidos à cirurgia cardíaca do que em amostras orais obtidas de indivíduos saudáveis nas quais o sorotipo *c* foi o mais prevalente sugerindo o possível envolvimento dos sorotipos menos comuns na doença cardiovascular (NAKANO *et al.*, 2007). Além disso os genes *cnm* e *cbm* foram predominantemente identificadas nos sorotipos *f* e *k*, respectivamente (NOMURA *et al.*, 2012a), sendo que a presença dessas cepas tem sido associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (NAKANO *et al.*, 2007; NOMURA 2012b; INENAGA *et al.*, 2018). Portanto a identificação dos sorotipos de *S. mutans* e seus genes de virulência que codificam proteínas de ligação ao colágeno poderá agregar valor à clínica médica como um possível biomarcador de agravamento do risco da doença cardíaca, especialmente em pacientes do grupo de risco para doenças cardiovasculares.

No entanto a atuação de cepas de *S. mutans* pertencentes aos sorotipos mais raros na cárie dentária é controversa, uma vez que a atividade de ligação ao glucano em isolados clínicos (*cnm*⁺) foi significativamente reduzida devido a ausência de *gbpA* que codifica a proteína A de ligação ao glucano (GbpA) (NAKANO *et al.*, 2010). Em outro estudo, 25% (5/20) das cepas de *S. mutans* que expressavam as proteínas de ligação ao colágeno não tinham o antígeno PA associado à adesão à superfície dentária independente da sacarose (NOMURA *et al.*, 2013). Contudo autores reportaram o envolvimento de cepas de *S. mutans* (*cnm*⁺ e/ou *cbm*⁺) no aumento do risco e severidade de cárie na primeira infância (LAMBDA *et al.*, 2020). A ausência de expressão do antígeno PA em cepas que expressam proteínas de ligação ao colágeno, de fato, embora possa diminuir o potencial de adesão inicial às superfícies dentárias intactas, pode potencializar a ligação dessas cepas aos substratos ricos em colágeno, como a dentina, possivelmente devido a alterações do potencial aniônico da superfície celular bacteriana e redução da hidrofobicidade celular na ausência do antígeno PA (NOMURA *et al.*, 2013). Vale

ressaltar que o colágeno do tipo I é a principal proteína da matriz extracelular do tecido dentinário perfazendo 85-90% da matriz orgânica (ORSINI *et al.*, 2014).

2.5 As proteínas de ligação ao colágeno de *S. mutans*

2.5.1 As proteínas de superfície celular (PA) e parede celular (WapA)

A proteína de superfície celular (antígeno PA), codificada pelo gene *pac*, é uma adesina de aproximadamente 190-kDa envolvida na adesão de *S. mutans* à película salivar (glicoproteína GP340) do esmalte dentário por um mecanismo independente da sacarose (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016; KOGA *et al.*, 1990). O antígeno PA é um polipeptídeo de 1.556 aminoácidos composto de quatro domínios principais: (i) um sinal de secreção N-terminal; (ii) uma região rica em alanina (região A); (iii) uma região rica em prolina (região P) e (iv) um domínio de ancoragem à parede celular - LPXTG (BRADY *et al.*, 2010). Além de interagir com os componentes da película salivar, o antígeno PA também contribui para a interação de *S. mutans* com diferentes tipos de moléculas da matriz extracelular, como colágeno do tipo I, fibronectina e laminina *in vitro* (BEG *et al.*, 2002; YUMOTO *et al.*, 2019). O antígeno PA, por vezes, é expresso em pequena quantidade em cepas do sorotipo *k* em comparação aos níveis de expressão detectados nos outros sorotipos da cavidade oral (NOMURA *et al.*, 2014).

Em adição ao antígeno PA, a WapA é outra proteína de adesão ao colágeno encontrada na superfície da parede celular de *S. mutans* (HAN; ZHANG; DAO, 2006). A proteína WapA é um polipeptídeo composto de quatro domínios principais: (i) um sinal de secreção N-terminal; (ii) um domínio de ligação ao colágeno (domínio A); (iii) um domínio rico em treonina (domínio B) e (iv) um domínio de ancoragem à parede celular - LPXTG (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016). No entanto, embora tenha sido comprovado que PA e WapA ligam-se ao colágeno *in vitro*, estudos adicionais são necessários para comprovar a eficiência dessas proteínas na ligação ao colágeno *in vivo* (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016).

2.5.2 As proteínas de ligação ao colágeno Cnm e Cbm

Entre os muitos genes não essenciais identificados em *S. mutans* estão os genes *cnm* e *cbm* que codificam as proteínas de superfície celular de ligação ao colágeno de, aproximadamente, 120 kDa: Cnm e Cbm (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.*, 2012a).

As análises genéticas de Cnm e Cbm revelaram a presença de quatro domínios principais: (i) um sinal de secreção N-terminal; (ii) um domínio de ligação ao colágeno (domínio A); (iii) um domínio rico em treonina (domínio B) e (iv) um domínio de ancoragem à parede celular – LPXTG (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.*, 2012a). Em adição as análises de bioinformática mostraram que a sequência de aminoácidos do domínio A de ligação ao colágeno da Cbm é altamente homóloga à sequência de aminoácidos do domínio A da proteína Cnm com 78% de identidade (NOMURA *et al.*, 2012a). No entanto, apesar da semelhança entre os domínios de ligação ao colágeno (domínio A) da Cbm e Cnm, a atividade de ligação ao colágeno e ao fibrinogênio de cepas Cbm positivas foi significativamente maior do que a atividade de ligação ao colágeno de cepas Cnm positivas (NOMURA *et al.*, 2012a; NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2014). Assim autores sugeriram que as diferenças entre as sequências de aminoácidos dessas proteínas contribuem para o maior potencial de ligação ao colágeno e fibrinogênio de cepas Cbm positivas (NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2014).

A proteína Cbm, em adição, é frequentemente identificada em cepas do sorotipo *k* (antígeno PA⁻) cuja ausência de expressão do antígeno PA pode resultar em alterações do potencial aniônico da superfície bacteriana e redução da hidrofobicidade que podem estar associadas aos níveis mais elevados de ligação ao colágeno de cepas Cbm positivas (NOMURA *et al.*, 2012a; NOMURA *et al.*, 2013). Além disso a interação de cepas Cbm positivas (PA⁻) com o fibrinogênio, o qual, por sua vez, liga-se aos receptores das glicoproteínas GPIIb/IIIa na membrana plaquetária, acelerou a formação de uma massa amorfa em um modelo animal para endocardite (NOMURA *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que bactérias alojadas em cárie dentinária são consideradas fontes primárias de infecção endodôntica, uma vez que a maioria das espécies encontradas em dentina cariada também foi encontrada em canais radiculares infectados (RÔÇAS *et al.*, 2015). Além da infecção endodôntica, procedimentos odontológicos como cirurgias, extrações e os cuidados de higiene bucal, como a escovação e o uso de fio dental, podem representar possíveis portas para entrada e disseminação de *S. mutans* na corrente sanguínea e resultar em bacteremia transitória que é o primeiro passo na patogênese de doenças sistêmicas causadas por bactérias

orais (SEYMOUR *et al.*, 2000).

2.6 A relação das proteínas de ligação ao colágeno Cnm e Cbm com a cárie dentária e doenças sistêmicas

2.6.1 A relação das proteínas Cnm e Cbm com a cárie dentária

Após um trauma dentário, lesões de cárie em dentina ou recessão gengival, substratos ricos em colágeno, como a dentina, o cimento, a raiz e as fibras do ligamento periodontal, ficam expostos e, portanto, representam um alvo em potencial para colonização e persistência de cepas de *S. mutans* que expressam proteínas de ligação ao colágeno (HO *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2020). Assim estudos clínicos sugeriram uma associação entre a presença de *S. mutans* (*cnm*⁺ e/ou *cbm*⁺) e o aumento do risco e severidade da cárie (MISAKI *et al.*, 2016; ESBERG *et al.*, 2017; LAMBA *et al.*, 2020). Por exemplo o índice de Dentes Cariados, Perdidos ou Obturados (CPO-D) em pacientes com nefropatia por imunoglobulina A e com *S. mutans* (*cnm*⁺) na saliva foi significativamente maior ($p < 0.05$) do que em pacientes diagnosticados com a mesma patologia nos quais a presença do gene *cnm* nas cepas de *S. mutans* isoladas da cavidade oral não foi detectada (MISAKI *et al.*, 2016). Um outro estudo realizado com crianças japonesas de 3 a 8 anos de idade mostrou uma maior incidência de cárie naquelas com *S. mutans* (*cnm*⁺) na saliva em comparação àquelas que também tinham *S. mutans*, mas sem a presença do gene *cnm* ($p < 0.01$) sugerindo que indivíduos portadores de *S. mutans* (*cnm*⁺) apresentam um risco maior de desenvolver cárie (NOMURA *et al.*, 2009). Além disso a presença da proteína Cnm na saliva total de crianças suecas foi considerada um fator de risco para o aumento da incidência de cárie durante um período de acompanhamento de 5 anos (12-17 anos) (ESBERG *et al.*, 2017). Recentemente, uma associação entre a presença de *S. mutans* (*cnm*⁺ e/ou *cbm*⁺) em placa dental e a cárie severa na primeira infância foi relatada em crianças canadenses menores de 6 anos (LAMBA *et al.*, 2020).

2.6.2 A relação das proteínas Cnm e Cbm com a endocardite infecciosa

A endocardite é uma infecção que se estabelece no endotélio cardíaco. As valvas cardíacas lesionadas, principalmente mitral e aórtica, são comumente afetadas pelo processo infeccioso, porém a infecção pode acontecer em qualquer estrutura do coração, como nos defeitos dos septos e cordas tendíneas ou no endotélio mural e nos “shunts” arteriovenosos e

arterio-arteriais (MURDOCH *et al.*, 2009). A incidência global da doença é de 3 a 10 casos por 100 mil indivíduos por ano, porém, mesmo rara, a taxa de mortalidade anual é de aproximadamente 30%, apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento (CAHILL; PRENDERGAST, 2016).

A lesão característica da endocardite é uma massa amorfa (vegetação) contendo microrganismos, sendo que os *Staphylococcus aureus*, estreptococos do grupo *viridans*, incluindo *S. mutans* e *S. bovis*, e *Enterococcus* spp., foram reconhecidos como os principais agentes etiológicos (VOGKOU *et al.*, 2016; KIM; GORDON; SHRESTHA, 2018). Neste contexto, sabe-se que *S. mutans* pode ser o agente etiológico de infecções extraorais, como bacteremia e endocardite (NAKANO; NOMURA; OOSHIMA, 2008a; KIM; GORDON; SHRESTHA, 2018). Um estudo realizado no Brasil detectou o DNA de *S. mutans* em 89,3% das amostras de valvas cardíacas analisadas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A patogênese da endocardite envolve a formação de uma massa amorfa que se origina de lesões físicas ou inflamatórias que levam à exposição de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno, produção de citocinas pró-inflamatórias e deposição de fibrina e plaquetas no sítio afetado (MOREILLON; QUE, 2004). Assim ao migrarem da cavidade oral para corrente sanguínea, cepas de *S. mutans* que expressam proteínas de ligação ao colágeno (Cnm e/ou Cbm) podem se ligar às fibras de colágeno expostas em um tecido danificado, bem como entrar e sobreviver no citoplasma de células endoteliais (ABRANCHES *et al.*, 2009; ABRANCHES *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2013). A invasão de células endoteliais, por conseguinte, pode levar ao desenvolvimento de infecções crônicas pelo escape dessas cepas à vigilância imunológica do hospedeiro e ao mecanismo de ação dos agentes terapêuticos (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016). Um outro mecanismo de evasão à resposta imune de cepas de *S. mutans* que expressam proteínas de ligação ao colágeno envolve a ligação dessas proteínas à opsonina C1q do sistema do complemento podendo resultar no bloqueio da ativação da resposta imunológica mediada pela via clássica desse sistema (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016).

Sabe-se que existe uma associação entre infecções extraorais e os sorotipos de *S. mutans* menos prevalentes (*e*, *f* e *k*) (NAKANO *et al.*, 2007; NAKANO *et al.*, 2011; NOMURA *et al.*, 2012b; NOMURA *et al.*, 2014). Além disso uma tendência semelhante tem sido observada em relação à distribuição das proteínas Cnm e Cbm, uma vez que a maioria das cepas que as expressam pertence aos sorotipos mais raros (*e*, *f* e *k*) (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016). Assim Nakano *et al.* (2007) demonstraram taxas de detecção significativamente maiores dos sorotipos *e* e *k* em amostras de valvas cardíacas e placas de atheroma obtidas de pacientes

submetidos a cirurgias cardiovasculares do que em amostras orais obtidas da saliva de indivíduos saudáveis ($p < 0,05$). Em adição a taxa de detecção de *S. mutans* (cbm^+) foi significativamente maior em amostras de valvas cardíacas coletadas de pacientes com endocardite do que em amostras de valvas cardíacas coletadas de pacientes com outras doenças valvares ($p = 0,0005$) (NOMURA *et al.*, 2012b). O mesmo estudo também mostrou que cepas Cbm positivas (sorotipo *k*) apresentaram níveis mais altos de ligação ao colágeno do tipo I e taxas mais elevadas de adesão e invasão às células endoteliais *in vitro* quando comparadas às cepas Cnm positivas (NOMURA *et al.*, 2012b). Vale mencionar que o colágeno do tipo I representa aproximadamente $\frac{3}{4}$ do colágeno presente em valvas cardíacas normais (COLE *et al.*, 1984). Assim as cepas Cbm positivas (sorotipo *k*) foram consideradas mais virulentas devido a sua maior afinidade de ligação ao colágeno exposto no endotélio danificado e ao fibrinogênio, especialmente na ausência do antígeno PA, o que resultou na interação e indução de agregação plaquetária e, por conseguinte, em formação de uma massa amorfa no endotélio, composta de bactérias, fibrinogênio e plaquetas (NOMURA *et al.*, 2014).

Em outra pesquisa, uma mutação no gene *pac* que codifica o antígeno PA na cepa *S. mutans* TW871 (sorotipo *k*, cnm^+) resultou em níveis mais elevados de ligação ao colágeno *in vitro* quando comparada à mesma cepa sem a manipulação genética sugerindo que o antígeno PA atua de modo antagônico à proteína Cnm na interação com o colágeno (NOMURA *et al.*, 2013). Além disso um estudo realizado em modelo animal de infecção de valvas cardíacas mostrou que a infecção com a cepa *S. mutans* TW295 (sorotipo *k*, cnm^+), que não expressa o antígeno PA, resultou na formação de uma vegetação de células composta de microrganismos, plaquetas e fibrina que não foi observada na infecção com cepas positivas para antígeno PA reforçando que a ausência de expressão do antígeno PA contribui para patogênese da endocardite infecciosa (OTSUGU *et al.*, 2017).

A formação de uma vegetação de células no endotélio danificado aumenta a resistência das bactérias às defesas do hospedeiro e ao tratamento com antibióticos (PARSEK; SINGH, 2003). Vale ressaltar que a ausência do antígeno PA resultou na diminuição da suscetibilidade de *S. mutans* à fagocitose mediada pelos leucócitos polimorfonucleares humanos e em maior duração da bacteremia implicando a ausência da expressão do antígeno PA em aumento da sua virulência sistêmica (NAKANO *et al.*, 2006a). Portanto identificar a presença de cepas pertencentes aos sorotipos menos prevalentes e portadoras de genes que codificam proteínas de ligação ao colágeno, especialmente em pacientes considerados de risco para a endocardite infecciosa e em tratamento médico ou odontológico, pode ser entendida com uma estratégia relevante na prevenção de doenças sistêmicas (NAKANO *et al.*, 2004b). Assim

a investigação de biomarcadores, como a presença dos genes *cnm* e *cbm* em isolados clínicos de *S. mutans*, serviria de triagem para pacientes com necessidade de tratamento preventivo antes da realização de procedimentos odontológicos (ABRANCHES *et al.*, 2011).

2.6.3 A relação das proteínas Cnm e Cbm com a hemorragia cerebral e outras doenças sistêmicas

Nakano *et al.* (2011) utilizaram um modelo animal de hemorragia cerebral e reportaram o agravamento do sangramento após a infecção dos animais com *S. mutans* TW295 (sorotipo *k*, *cnm*⁺) e com a proteína recombinante Cnm. Os pesquisadores relataram que a bacteremia induzida por *S. mutans* pode ser um fator de risco para o agravamento da hemorragia cerebral pela acumulação e ligação de cepas expressando Cnm ao colágeno exposto após a ruptura da parede do vaso, seguida de inibição de agregação plaquetária, possivelmente pelo bloqueio do mecanismo de ação do fator de von Willebrand (fvW) circulante no plasma que atua como mediador da ligação entre o colágeno exposto e o receptor da glicoproteína Ib (GPIb) da membrana plaquetária para promover agregação plaquetária (NOMURA *et al.*, 2014). O acúmulo de *S. mutans* expressando Cnm, em adição, resultou na ativação da metaloproteinase-9 e intensificação da hemorragia cerebral (NAKANO *et al.*, 2011).

Além disso estudos mostraram que a atividade de ligação ao colágeno de *S. mutans* (*cnm*⁺) presente na saliva humana foi considerada um fator de risco para a ocorrência de microsangramentos cerebrais e hemorragia intracerebral (MIYATANI *et al.*, 2015; WATANABE *et al.*, 2016, TONOMURA *et al.*, 2016; INENAGA *et al.*, 2018). Desse modo a ligação ao colágeno exposto no vaso lesionado não apenas facilitaria a colonização bacteriana, como também agravaria a hemorragia pelo bloqueio dos mecanismos de reparo dos tecidos lesionados (AVILÉS-REYES *et al.*, 2016).

Não o bastante autores mostraram que cepas de *S. mutans* (sorotipo *k*, *cnm*⁺) representam um fator de risco para outras complicações sistêmicas como a colite ulcerativa (KOJIMA *et al.*, 2012), a esteatose hepática não alcoólica (NAKA *et al.*, 2016) e a nefropatia por IgA (ITO *et al.*, 2019).

2.7 A relação de *S. mutans* com a aterosclerose e o IAM

A Doença Arterial Coronariana (DAC), também conhecida como Doença Isquêmica do Coração (DIC), compreende uma diversidade de condições clínicas assintomáticas e sintomáticas tipicamente associadas à redução do fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco, cuja causa mais comum é a doença aterosclerótica das artérias coronárias, uma condição crônica de apresentação variável que tem o IAM como um dos seus principais desfechos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). O IAM é patologicamente definido como a morte celular do miocárdio devido a uma isquemia prolongada (THYGESSEN *et al.*, 2018). De acordo com dados do estudo GBD (2017), a prevalência estimada de DAC na população adulta brasileira foi de 0,53% (15-49 anos), 4,34% (50-69 anos) e 10,99% (>70 anos), enquanto a prevalência geral padronizada por idade foi de 1,63% (1,564 por 100 mil habitantes) (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Além disso o GBD (2017) estimou em 1.736 (IC 95%, 1.689 – 1779) dias de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs) por DAC por 100 mil habitantes (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A aterosclerose, que se caracteriza pela retenção de colesterol na parede arterial, remodelamento vascular e estreitamento do lúmen arterial, é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta a agressões ao endotélio vascular de artérias causadas por estímulos irritativos como altas concentrações plasmáticas do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (ROSS, 1999; RENKO *et al.*, 2008; PAHWA; JIALAL, 2020).

As lesões da aterosclerose ocorrem principalmente em artérias de médio e grande calibres e podem levar à isquemia do coração, cérebro ou extremidades, resultando em infarto (ROSS, 1999). Em uma artéria normal, existem três camadas de tecidos: a interna (endotélio), a média (íntima e média) e a externa (adventícia). A aterogênese é o processo de formação de placas de ateroma na camada íntima das artérias (ATHANASIOU; FOTIADIS; MICHALIS, 2017).

O primeiro estágio da aterosclerose é caracterizado pelo acúmulo do LDL-c e inflamação da parede arterial (disfunção endotelial) (ATHANASIOU; FOTIADIS; MICHALIS, 2017). Em resposta aos estímulos irritativos, as células endoteliais expressam quimiocinas, como a MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), e moléculas de adesão à superfície celular, como VCAM-1 (molécula de adesão vascular 1), que atraem e capturam monócitos em suas superfícies, os quais, por diapedese, migram para a camada íntima da parede arterial (LIBBY, 2002; ATHANASIOU; FOTIADIS; MICHALIS, 2017).

As mudanças na permeabilidade endotelial também possibilitam a migração de partículas do LDL-c para a camada íntima (TABAS; WILLIAMS; BOREN, 2007). Dentro da íntima, os monócitos se transformam, via fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), em macrófagos que liberam espécies reativas de oxigênio para oxidar partículas do LDL-c, assim como expressam receptores para internalização dessas partículas oxidadas (LDL-oxi) resultando no acúmulo de colesterol derivado da LDL e formação de células espumosas (LIBBY, 2002; ATHANASIOU; FOTIADIS; MICHALIS, 2017; PAHWA; JIALAL, 2020). Por sua vez as células espumosas liberam citocinas pró-inflamatórias (Interleucina-1, Interleucina- 6 e Interleucina-8) que amplificam a resposta inflamatória no sítio da lesão (LIBBY, 2002).

As bactérias da cavidade oral podem colonizar as placas ateroscleróticas humanas e ativar macrófagos intraplaca para secretar mediadores pró-inflamatórios (citocinas, espécies reativas de oxigênio, moléculas vasoativas e proteases) resultando em lesão celular endotelial localizada e instabilidade/vulnerabilidade da placa. (HANSSON; ROBERTSON; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006).

Dentro do ateroma em crescimento, citocinas pró-inflamatórias também estimulam a migração de células musculares lisas da camada média para a camada íntima da parede arterial para formação de placa fibrosa rica em colágeno, situada abaixo do endotélio, que confere proteção contra a ruptura da placa (HANSSON; ROBERTSON; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006; PAHWA; JIALAL, 2020).

A ruptura e/ou erosão da placa aterosclerótica, em resposta à intensificação do processo inflamatório, expõe o sangue circulante ao seu núcleo altamente trombogênico e leva à ativação de plaquetas e fatores de coagulação resultando na formação de um trombo e obstrução do fluxo sanguíneo para a região afetada do músculo cardíaco, caracterizando o infarto (HANSSON; ROBERTSON; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006; ANDERSON; MORROW, 2017). No Brasil, em 2018, ocorreram 142.982 hospitalizações por IAM com taxa de mortalidade hospitalar de 11% (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os fatores de risco tradicionais para aterosclerose incluem hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, obesidade, tabagismo e sedentarismo, porém muitos casos não são explicados pelos fatores citados (PUCAR *et al.*, 2007). Além disso autores sugeriram o envolvimento de infecções por bactérias periodontais e cariogênicos no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (HARASZTHY *et al.*, 2000; PUCAR *et al.*, 2007; KOZAROV *et al.*, 2006; NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014). Recentemente, Misaki, Fukunaga e Nakano (2021) concluíram o que a cárie dentária pode exercer um efeito indireto no prognóstico da aterosclerose.

Para estudar a correlação entre bactérias orais e a ocorrência de aterosclerose, pesquisas têm sido conduzidas para elucidar os possíveis mecanismos e processos inflamatórios mediados por esses microrganismos na etiopatogênese dessa doença. Assim estudos *in vitro* demonstraram que *S. mutans* possui a capacidade de se ligar às proteínas da matriz extracelular, como o colágeno (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.* 2012b; LIMA *et al.*, 2020), invadir e persistir no citoplasma de células endoteliais de artérias coronárias humanas (ABRANCHES *et al.*, 2009; ABRANCHES *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2020), aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias (Interleucina- 6, Interleucina- 8 e MCP-1) relacionadas à aterosclerose (NAGATA; TOLEDO; OHO, 2011), induzir formação de células espumosas (KURAMITSU *et al.*, 2001) e agregação plaquetária (NOMURA *et al.*, 2014) que são eventos fortemente associados à patogênese da aterosclerose. Ainda, Kesavalu *et al.* (2012) demonstraram, em modelo animal, que a cepa invasiva OMZ175 (sorotipo *f*, *cnm*⁺) acelerou o aumento da resposta inflamatória e o desenvolvimento de placa aterosclerótica.

Em sintonia com esses achados, vários estudos demonstraram a presença de bactérias orais, incluindo *S. mutans*, em lesões ateroscleróticas humanas (KOZAROV *et al.*, 2006; NAKANO *et al.*, 2006b; NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014). Nakano *et al.* (2006b), por exemplo, relataram que *S. mutans* foi a bactéria mais frequente em tecidos de valvas cardíacas e placas de ateroma com uma prevalência de 68,6% e 74,1%, respectivamente. Kozarov *et al.* (2006), em adição, relataram a presença de DNA de *S. mutans* em placas de ateroma de 22,5% dos pacientes mais jovens (~ 27 anos) e 44,4% dos pacientes mais velhos (~ 67 anos). Em um estudo realizado no Brasil, o DNA de *S. mutans* foi identificado em 100% das amostras orais (saliva e placa supragengival e placa subgengival) e placas ateroscleróticas coletadas de pacientes com doença vascular (FERNANDES *et al.*, 2014). Significativamente, Nakano *et al.* (2007) demonstraram uma prevalência estatisticamente significativa dos sorotipos *e* e *k* em amostras de placa dental coletadas de pacientes submetidos à cirurgia para retirada de placa aterosclerótica, enquanto cepas do sorotipo *c*, o sorotipo mais comum na cavidade oral, prevaleceram em amostras orais obtidas de indivíduos saudáveis do grupo controle. Coletivamente, esses achados sugerem que cepas específicas de *S. mutans* podem desempenhar um papel na infecção de tecidos cardiovasculares sendo que os indivíduos que abrigam tais cepas podem ter maior risco de infarto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a prevalência de *S. mutans*, seus sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*), seus genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) em amostras de placa dental e sua relação com a cárie dentária e o IAM em adultos infartados com menos de 50 anos de idade e voluntários sem histórico de doença cardíaca.

3.2 Objetivos específicos

Relacionar a presença de *S. mutans*, seus sorotipos e seus genes *cnm* e *cbm* em amostras de placa dental com a cárie dentária em adultos infartados antes dos 50 anos de idade e voluntários sem histórico de doença cardíaca.

Relacionar a presença de *S. mutans*, seus sorotipos e genes *cnm* e *cbm* em amostras de placa dental com IAM em adultos infartados antes dos 50 anos de idade e voluntários sem histórico de doença cardíaca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 O delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal caso-controle em que amostras de placa dental (biofilmes dentários) foram coletadas e avaliadas para identificação de *S. mutans*, seus sorotipos (*c*, *e*, *f* e *k*) e seus genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral e no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC). A pesquisa foi realizada com amostras de placa dental de adultos infartados com menos de 50 anos e de voluntários sem histórico de doença cardíaca.

4.2 As coletas das amostras de placa dental

O estudo foi realizado com amostras de conveniência (placa dental) coletadas de 31 adultos com histórico de IAM por doença arterial coronariana do tipo aterosclerótica antes dos 50 anos de idade ($39,6 \pm 5,2$ anos; 30-49 anos) e que foram acompanhados no Ambulatório de Cardiologia do Hospital de Messejana Dr. Calos Alberto Studart Gomes, Fortaleza, Ceará, pela médica Rochelle Pinheiro Ribeiro (CRM CE 6654), durante a execução do projeto para análise de mutações genéticas da Paraoxonase humana- 1 “*Associação de polimorfismos genéticos da Paraoxonase 1 (PON1) com síndrome coronariana aguda em pacientes jovens*” (PROTOCOLO CEP/UFC N° 2.206.472, Ceará, Brasil). Foram coletadas as informações sobre comorbidades e aspectos sociodemográficos durante anamnese e busca nos prontuários desses pacientes.

Assim, para uso dessas amostras com as novas análises, o presente estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (PROTOCOLO CEP/UFC 29466020.1.0000.5054, Ceará, Brasil-Anexo A) sendo aprovado. A pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) (n° A273C0A-Anexo B). Além disso, com base na idade dos pacientes infartados na data da coleta das amostras de placa dental ($46,9 \pm 6,9$; 30-63 anos), 17 voluntários ($45,5 \pm 8,9$; 28-63 anos), sem histórico de doença cardíaca, com idade e sexo pareados aos do grupo de pacientes cardiopatas, integraram o grupo controle.

Os perfis glicêmicos e lipídicos séricos de todos os participantes foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, conforme as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes e Sociedade Brasileira Cardiologia, cujos parâmetros de normalidade utilizados como referência foram: glicose (< 100 mg/dL), colesterol total (< 190 mg/dL), HDL-c (> 40 mg/dL), LDL-c (< 130 mg/dL) e triglicérides (< 150 mg/dL).

A avaliação da presença e severidade de lesões de cárie de todos os participantes do estudo foi aferida pelo Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS), um método de detecção e diagnóstico de lesões de cárie idealizado para ser usado na prática clínica, pesquisa e programas em saúde pública. O sistema é baseado em critérios visuais para a detecção das lesões em estágio bem inicial determinando também a sua gravidade. Neste estudo, o ICDAS foi aplicado pelo cirurgião-dentista João Eudes Teixeira Pinho Filho (CRO CE-7598) que foi treinado e calibrado através da utilização de fotos de trabalhos originais, atendimento de pacientes e do programa *on-line* disponibilizado para o índice ICDAS (ISMAIL *et al.*, 2007). Os dentes foram examinados primeiramente úmidos e, depois, após secagem com seringa tríplice por 5 segundos. No ICDAS, cada dente é dividido em superfícies mesial, distal, vestibular, lingual e oclusal e segue a classificação abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 – A classificação da presença e severidade de cárie baseada nos critérios do ICDAS

Códigos	Interpretação
0	Nenhuma ou sutil alteração na translucidez do esmalte após secagem por 5 segundos
1	Opacidade dificilmente visível na superfície úmida, mas notável após secagem prolongada
2	Opacidade visível sem secagem
3	Cavidade localizada em esmalte opaco ou pigmentado
4	Sombreamento da dentina subjacente
5	Cavitação em esmalte opaco ou pigmentado com exposição de dentina subjacente envolvendo menos da metade da superfície do dente
6	Cavitação em esmalte opaco ou pigmentado com exposição da dentina subjacente envolvendo mais de metade da superfície dentária

Fonte: Ismail *et al.* (2007, com adaptações)

ICDAS = Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie.

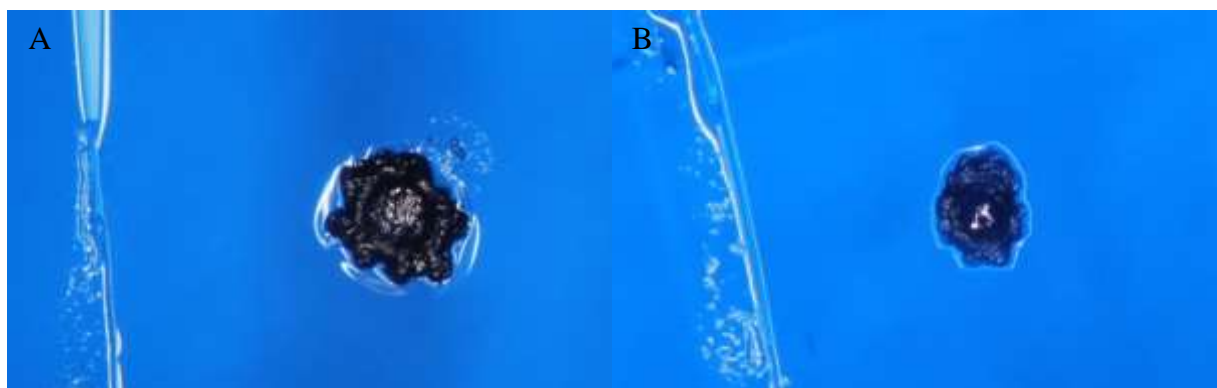
Após a aplicação do ICDAS, amostras de placa dental foram coletadas das superfícies de dentes permanentes de todos os participantes do estudo pelo cirurgião-dentista João Eudes Teixeira Pinho Filho (CRO CE-7598) com o auxílio de curetas de Gracey (Trinity®, São Paulo, SP, Brasil) e armazenadas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater™ Ambion

Inc., Austin, TX, E.U.A.) em freezer -80°C para posterior realização das análises microbiológicas e moleculares.

4.3 A ativação das amostras de placa dental e a obtenção dos isolados bacterianos da placa dental

As amostras de placa dental, previamente coletadas e armazenadas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater™ Ambion Inc., Austin, TX, E.U.A.) em freezer -80°C , foram descongeladas, submetidas a aparelho de vórtex (60 segundos) e semeadas por esgotamento (50 μL) em placas de ágar Mitis Salivarius (Difco Laboratories, Detroit, MI, E.U.A.) contendo 0,2 U/mL de bacitracina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, E.U.A.), 0,001% de solução de telurito de potássio (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, E.U.A.) e 20% de sacarose (meio seletivo ágar Mitis Salivarius Bacitracina) (GOLD; JORDAN; HOUTE, 1973). As placas do meio de cultivo foram incubadas em estufa bacteriológica (37°C , 5% de CO_2 por 48 horas). Em seguida, 5-15 isolados compatíveis com a morfologia de *S. mutans* (colônias de aparência rugosa ou lisa, variando entre azul escuro a preto, às vezes firmemente aderidas ao ágar e às vezes com uma camada de polissacarídeo brilhante na parte superior ou lateral da colônia) (Figura 3), quando disponíveis, foram selecionados e cultivados, isoladamente, em 10 mL de Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Acumedia Laboratories, Lansing, MI, E.U.A.) em 37°C , 5% de CO_2 por 18-24 horas (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009; NOMURA; OGAYA; NAKANO, 2016).

Figura 3 – Os aspectos morfológicos das colônias de *S. mutans* em ágar Mitis Salivarius Bacitracina



Fonte: elaborada pelo autor.

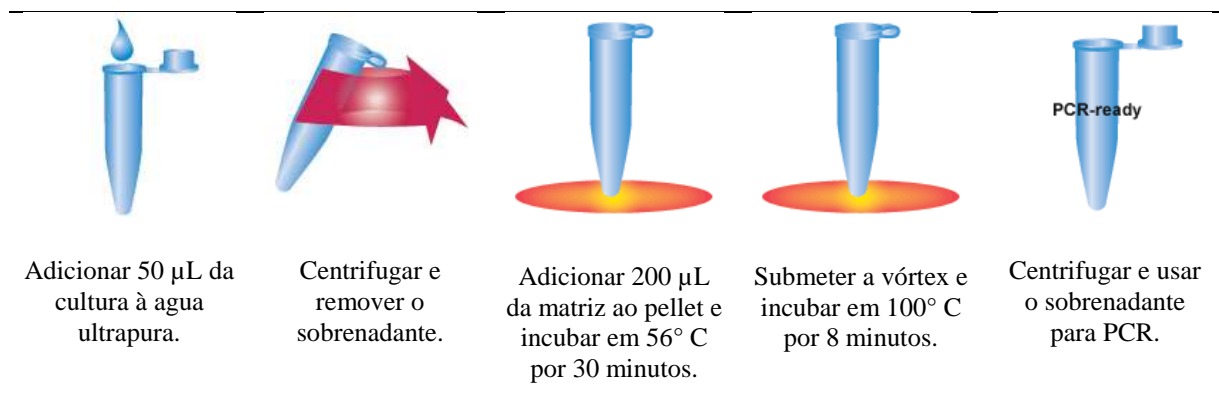
Aspectos morfológicos da colônia de *S. mutans*: (A) colônia de aparência rugosa aderida ao ágar; (B) colônia de aparência rugosa aderida ao ágar contendo uma gota de polissacarídeo brilhante na parte superior (NIKON D60).

Após o crescimento em caldo BHI, as amostras foram armazenadas em caldo BHI contendo 20% de glicerol (200 μ L da cultura bacteriana adicionados a 200 μ L de BHI estéril suplementado com 40% de glicerol) e armazenadas em freezer -80 °C para posterior extração de DNA.

4.4 A extração de DNA dos isolados bacterianos e das amostras de placa dental

As amostras armazenadas em BHI glicerol (-80° C), 5-15 amostras de cada participante do estudo, foram descongelados assepticamente e 100 μ L inoculados em 10 mL de caldo BHI e cultivadas em 37° C, 5% de CO₂ por 18-24 horas. A matriz InstaGene (Bio-Rad 732-6030; Hercules, CA, E.U.A.) foi utilizada para extração de DNA dos isolados bacterianos da placa dental (Figura 4).

Figura 4 – O protocolo para extração de DNA das amostras analisadas



Fonte: SHIN (2012, com adaptações).

Em resumo, 50 μ L da cultura em caldo BHI foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultrapura livre de nucleases (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A), submetido a vórtex e centrifugado em 12.000 rpm por 1 minuto (Eppendorf microcentrifuge, Model 5415R, Hamburg, Alemanha). Após a etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 200 μ L da matriz InstaGene (Bio-Rad 732-6030; Hercules, CA, E.U.A.) foram adicionados ao precipitado e a amostra incubada em banho seco em 56 °C por 15-30 minutos (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, a amostra foi submetida a vórtex por 10 segundos e novamente incubada, desta vez, em 100 °C por 8 minutos. Finalmente, a amostra foi submetida a vórtex em alta velocidade por 10 segundos, centrifugada em 12.000 rpm por 3 minutos (Eppendorf microcentrifuge, Model 5415R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante, contendo o DNA, transferido para um novo tubo de

microcentrífuga estéril resultando em volume de eluição final de 160 µL. A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria em 260 nm usando um espectrofotômetro microvolume UV-vis (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Waltham, MA, E.U.A). O DNA foi ajustado (20 ng/µL) e armazenado em -20° C para as análises de PCR.

A matriz InstaGene (Bio-Rad 732-6030; Hercules, CA, E.U.A) também foi empregada para extração de DNA das amostras de placa dental utilizando-se 200 µL da amostra armazenada em solução estabilizadora de (RNAlater™ Ambion Inc., Austin, TX, E.U.A.) conforme protocolo de extração e quantificação detalhados acima.

4.5 As reações em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA da placa dental e dos isolados bacterianos da placa dental, obtidas conforme protocolo detalhado acima, foram analisadas para identificação de *S. mutans*, sorotipos e genes de proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) pela técnica da PCR. A Tabela 3 apresenta a relação dos primers usados nas PCR.

Tabela 3 – A sequência dos primers utilizados nas PCR

Finalidade	Primer	Sequência 5'-3'	pb	Referência
<i>S. mutans</i>	gtf B-F	5'-ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG-3	517	OHO <i>et al.</i> 2000
	gtf B-R	5'-CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC-3		
Sorotipo <i>c</i>	SC-F	5'- CGGAGTGCTTTTTACAAGTGCTGG -3'	727	SHIBATA <i>et al.</i> , 2003
	SC-R	5'- AACCACGGCCAGCAAACCCTTTAT -3'		
Sorotipo <i>e</i>	SE-F	5'- CCTGCTTTTCAAGTACCTTTCGCC -3'	517	SHIBATA <i>et al.</i> , 2003
	SE-R	5'- CTGCTTGCCAAGCCCTACTAGAAA -3'		
Sorotipo <i>f</i>	SF-F	5'- CCCACAATTGGCTTCAAGAGGAGA -3'	316	SHIBATA <i>et al.</i> , 2003
	SF-R	5'- TGCGAAACCATAAGCATAGCGAGG -3'		
Sorotipo <i>k</i>	CEFK-F	5'- ATTCCC GCCGTTGGACCATTC C -3'	294	NAKANO <i>et al.</i> , 2004b
	K-R	5'- CCAATGTGATTCATCCCATCAC -3'		
<i>cnm</i>	cnm-DF	5'- TGGAGGTT CAGGGCAAGTATGTTGGTGATT -3'	579	NOMURA <i>et al.</i> , 2012a
	cnm-DR	5'- GTCTTTTGATCAGGATTGTCAACTTTAGTC -3'		
<i>cbm</i>	cbm-EF	5'- AGCTGAAGTTAGTGTTGTAAAACCTGCTTC -3'	393	NOMURA <i>et al.</i> , 2012a
	cbm-ER	5'- TAGGATCATCAACCTTAGTCAAGTACACGA -3'		

Fonte: elaborada pelo autor. PCR: (Reação em Cadeia da Polimerase); *S. mutans*: *Streptococcus mutans*; pb: (par bases).

As PCR foram realizadas em termociclador (Bio-Rad 184-5096; sistema CFX96™ Touch, Hercules, CA, E.U.A) de acordo com os parâmetros de ciclagem detalhados abaixo:

4.5.1 A identificação de *S. mutans* das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental

As amostras de DNA da placa dental e dos isolados bacterianos da placa dental foram analisadas para identificação de *S. mutans* pela técnica da PCR convencional. As reações foram preparadas em duplicata em um volume total de 50 µL, contendo 45 µL do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A), 100 nM dos primers (gtfB-F/gtfB-R) e 2 µL de DNA (~ 20 ng/µL). Os primers gtfB-F/gtfB-R amplificam um segmento do gene *gtfB* que é específico de *S. mutans* e, por isso, podem ser usados na sua identificação (OHO *et al.*, 2000; VILLHAUER; LYNCH; DRAKE, 2017). O DNA de *S. mutans* UA159 foi utilizado como controle positivo da reação (Tabela 4).

Tabela 4 – As cepas padrão utilizadas no presente estudo

Cepas	Sorotipo	Genes (<i>cnm/cbm</i>)	Descrição	Fonte
<i>S. mutans</i> UA159	<i>c</i>	<i>cnm⁻/cbm⁻</i>	Placa dentária	University of Alabama.
* <i>S. mutans</i> NN2002	<i>e</i>	<i>cnm⁻/cbm⁻</i>	Isolado oral de um garoto de 9 anos	NAKANO <i>et al.</i> , 2004a
* <i>S. mutans</i> OMZ-175	<i>f</i>	<i>cnm⁺/cbm⁻</i>	Placa dentária	B. Guggenheim
* <i>S. mutans</i> YT1	<i>k</i>	<i>cnm⁻/cbm⁺</i>	Isolado oral de um garoto saudável de 6 anos	NAKANO <i>et al.</i> , 2004a

Fonte: elaborada pelo autor.

*Cepas doadas pelo Dr. Kazuhiko Nakano (Universidade de Osaka, Japão) (Anexo D).

Água livre de nucleases foi utilizada em substituição ao DNA como controle negativo de contaminação. As amostras foram submetidas aos seguintes parâmetros de ciclagem: 95° C por 4 minutos (*hot start* para ativação da *Taq* polimerase), seguidos de 30 ciclos de 95° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto, com uma extensão final a 72° C por 10 minutos (VILLHAUER; LYNCH; DRAKE, 2017). Os produtos amplificados na PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão 1 x Tris-borato-EDTA (TBE) [0,1 M Tris; 0,09 M ácido bórico; 0,001 M EDTA (pH 8,0)]. Um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A) foi aplicado ao gel para dimensionar o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos. As bandas de DNA foram coradas

com SYBR Safe (1:10000 v/v) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A), adicionado ao gel na fase de preparação, e visualizadas sob luz ultravioleta (320 nm) no transiluminador modelo L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

4.5.2 A determinação dos sorotipos de *S. mutans* das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental

As amostras de DNA da placa dental e dos isolados bacterianos da placa dental positivos para *S. mutans* foram analisadas para determinação dos sorotipos pela técnica da PCR convencional. As reações foram preparadas em duplicata em um volume total de 50 µL, contendo 45 µL do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A), 100 nM dos primers (SC-F/SC-R; ou SE-F/SE-R; ou SF-F/SF-R; ou CEFK-F/K-R) e 2 µL de DNA (~20 ng/µL). Amostras de DNA de *S. mutans* UA159 (sorotipo *c*), ou NN2002 (sorotipo *e*), ou OMZ-175 (sorotipo *f*) ou YT1 (sorotipo *k*) foram utilizadas como controles positivos da reação (Tabela 2). Água livre de nucleases foi utilizada em substituição ao DNA como controle negativo de contaminação. As amostras foram submetidas aos seguintes parâmetros de ciclagem: 95° C por 4 minutos (*hot start* para ativação da *Taq* polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, com uma extensão final a 72° C por 7 minutos (NAKANO *et al.*, 2004b; MOMENI *et al.*, 2019). Os produtos amplificados foram analisados conforme descrito na seção 4.5.1

4.5.3 A identificação dos genes *cnm* e *cbm* das amostras de placa dental e isolados bacterianos da placa dental

As amostras de DNA da placa dental e dos isolados bacterianos da placa dental positivas para *S. mutans* foram analisadas para identificação dos genes *cnm* e *cbm* pela técnica da PCR multiplex. As reações foram preparadas em duplicata em um volume total de 50 µL, contendo 45 µL do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, E.U.A), 100 nM dos primers (*cnm*-DF/*cnm*-DR; e *cbm*-EF/*cbm*-ER) e 2 µL de DNA (20 ng/µL). Amostras de DNA de *S. mutans* OMZ-175 (*cnm*⁺) e YT1 (*cbm*⁺) foram utilizadas como controles positivos da reação (Tabela 2). Água livre de nucleases foi utilizada em substituição ao DNA como controle negativo de contaminação. As amostras foram submetidas aos seguintes parâmetros de ciclagem: 95° C por 4 minutos (*hot start* para ativação da *Taq* polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, 60° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos,

com uma extensão final a 72° C por 7 minutos (NOMURA *et al.*, 2012a; MOMENI *et al.*, 2019). Os produtos amplificados foram analisados conforme descrito na seção 4.5.1.

4.6 A análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows. Na estatística descritiva, foram calculados média, desvio-padrão, valores mínimos e máximos para as variáveis quantitativas, além das frequências absoluta e percentual para as variáveis qualitativas. Na estatística analítica, utilizou-se o teste Qui-quadrado de *Pearson* para investigar a associação entre variáveis categóricas independentes. A análise de covariância (ANCOVA) foi aplicada para investigar o efeito do colesterol sobre a idade no infarto, ajustado pela idade dos pacientes infartados na data da coleta das amostras de placa dental. A Regressão Logística Binária foi aplicada para prever se a presença de *S. mutans* e os níveis de colesterol estão associados à ocorrência de infarto. Utilizou-se $p < 0,05$ como valor de referência para a significância estatística.

5 RESULTADOS

Um total de 31 pacientes infartados, com média (Média \pm DP) de idade no infarto de $39,6 \pm 5,2$ anos (variação 30 - 49 anos) e média de idade na ocasião da coleta da placa dental de $46,9 \pm 6,9$ anos (variação 30 - 63 anos), foram analisados neste estudo. Além desses, 17 voluntários, sem histórico de doença cardíaca, com média de idade na ocasião da coleta da placa dental de $45,5 \pm 8,9$ anos (variação 28 - 63 anos), com idade e sexo pareados aos do grupo de pacientes infartados, foram envolvidos no estudo (Tabela 5).

Tabela 5 – A caracterização demográfica da população estudada

Variáveis	Grupos	
	Infartado	Controle
Demográficas	<i>n</i> = 31	<i>n</i> = 17
*Masculino	22 (71,0%)	11 (64,7%)
*Feminino	9 (29,0%)	6 (35,3%)
#Idade na coleta	$46,9 \pm 6,9$ (30-63 anos)	$45,5 \pm 8,9$ (28-63 anos)
#Idade no infarto	$39,6 \pm 5,2$ (30-49 anos)	-

Fonte: elaborada pelo autor.

*Dados qualitativos expressos em forma de “n (%)”. #Dados quantitativos expressos em forma de “Média \pm DP (mínima-máxima).”

No grupo dos pacientes infartados, 48,4% (15/31) apresentaram pelo menos um dos fatores de risco clássicos para aterosclerose e, conseqüentemente, para o IAM. No entanto 51,6% (16/31) não tinham fatores de risco clássicos para cardiopatias (Tabela 6).

Tabela 6 - Os fatores de risco apresentados pelos pacientes infartados

Variáveis	n	%
Amostra total	31	100
*HAS	2	6,5
Diabetes	2	6,5
Dislipidemia	1	3,2
Tabagismo	6	19,3
HAS e Tabagismo	1	3,2
†HFDAC e Tabagismo	1	3,2
HFDAC e Dislipidemia	2	6,5
Nenhum	16	51,6

Fonte: elaborada pelo autor.

*HAS, hipertensão arterial sistêmica; †HFDAC, história familiar de doença arterial coronariana prematura.

Os pacientes infartados apresentaram as maiores médias (Média \pm DP) de dentes ausentes ($8,3 \pm 5,8$), de cárie em esmalte ($2,5 \pm 2,3$) e de cárie em dentina ($1,1 \pm 1,8$). O grupo controle apresentou a maior média de dentes hígidos ($24,8 \pm 5,8$) (Tabela 7). No geral, 74,2% dos infartados tinham cárie em esmalte contra 52,9% do grupo controle e 38,7% dos infartados tinham cárie em dentina contra 29,4% do grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7 – O perfil de saúde bucal da população estudada pelos critérios do ICDAS

Variáveis	Infartados		Controles	
	Média de número de dentes por indivíduo (n=31)	Porcentagem de indivíduos com a condição na população (n=31)	Média de número de dentes por indivíduo (n=17)	Porcentagem de indivíduos com a condição na população (n=17)
*Dentes ausentes	$8,3 \pm 5,8$ (0 - 29 dentes)	96,8% (30/31)	$5,4 \pm 4,5$ (0 - 17 dentes)	94,1 % (16/17)
Dentes hígidos (ICDAS 0)	$20,0 \pm 6,4$ (1 - 31 dentes)	19,4 % (6/31)	$24,8 \pm 5,8$ (11 - 32 dentes)	41,2 % (7/17)
Dentes com cárie em esmalte (ICDAS 1,2 e 3)	$2,5 \pm 2,3$ (0 - 7 dentes)	74,2% (23/31)	$1,2 \pm 1,4$ (0 - 4 dentes)	52,9% (9/17)
Dentes com cárie em dentina (ICDAS 4,5 e 6)	$1,1 \pm 1,8$ (0 - 6 dentes)	38,7% (12/31)	$0,6 \pm 1,4$ (0 - 5 dentes)	29,4% (5/17)

Fonte: elaborada pelo autor.

*Os dentes ausentes foram computados sem a especificação da razão da perda. ICDAS = Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie.

Os parâmetros glicêmicos e lipídicos séricos dos infartados e controles estão apresentados na Tabela 8, nos quais os pacientes infartados apresentaram Média \pm DP ($34,4 \pm 6,4$) para o HDL-c abaixo do desejável.

Tabela 8 – Os perfis glicêmicos e lipídicos da população estudada

Variáveis Parâmetros (mg/dL)	Infartados		Controles	
	Desejável	Média ± DP	Desejável	Média ± DP
Glicose	< 100	101,7 ± 32,2	70 - 99	89,5 ± 8,8
Colesterol total	< 190	160,8 ± 52,8	< 190	205,8 ± 34,1
HDL-c	> 40	34,4 ± 6,4	> 40	55,0 ± 12,9
LDL-c	< 130	97,3 ± 48,6	< 130	127,1 ± 28,7
Triglicérides	< 150	131,7 ± 87,5	< 150	124,8 ± 66,3

Fonte: elaborada pelo autor.

HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade.

Neste estudo, 5 amostras (amostras 09, 13, 16, 26 e 31) de placa dental dos pacientes infartados testaram positivas para *S. mutans* (16,1%; 5/31) (Tabela 9). A análise do DNA de 205 isolados bacterianos (5-15 isolados por indivíduo), obtidos a partir do plaqueamento das 31 amostras de placa dental dos infartados em meio seletivo, possibilitou a identificação de mais 2 pacientes (2/26) portadores de *S. mutans* (amostras 02 e 24), cujas amostras de placa dental haviam testadas negativas para *S. mutans* (Tabela 9) e (Figura 5). No total, 7 dos 31 pacientes infartados (22,6%) foram confirmados como portadores de *S. mutans* pela técnica da PCR (Tabela 9).

Tabela 9 – A identificação de *S. mutans*, sorotipos e genes *cnm* e *cbm* das amostras analisadas dos pacientes infartados

Código das amostras	Identificação de <i>S. mutans</i>		Sorotipos		Genes (<i>cnm</i> / <i>cbm</i>)
	Placa dental (n = 31)	Isolados bacterianos (n = 205)	Placa dental (n = 7)	Isolados bacterianos (n = 30)	Placa dental/ Isolados bacterianos
02	Negativo	1 positivo (*1/15)	NE	<i>e</i>	Ausentes
09	Positivo	5 positivos (*5/5)	<i>e</i>	<i>e</i>	Ausentes
13	Positivo	2 positivos (*2/15)	<i>e</i>	<i>e</i>	Ausentes
16	Positivo	11 positivos (*11/15)	<i>c</i>	<i>c</i>	Ausentes
24	Negativo	1 positivo (*1/15)	NE	<i>c</i>	Ausentes
26	Positivo	5 positivos (*5/15)	<i>c e k</i>	<i>c e k</i>	Ausentes
31	Positivo	5 positivos (*5/5)	<i>c</i>	<i>c</i>	Ausentes

Fonte: elaborada pelo autor.

NE = não encontrado; *proporção de isolados positivos para *S. mutans* dentre os isolados analisados de cada indivíduo.

Figura 5 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para *S. mutans*



Fonte: elaborada pelo autor.

Géis de agarose a 1,5 % contendo fragmentos amplificados do gene *gtfB* dos isolados da placa dental positivos para *S. mutans* dos grupos: a) infartado (2D-16G); b) infartado (16H-31A); c) infartado (31B-31E) e controle (6A-6E). A seta à direita indica fragmentos de 517 pb amplificados do gene-alvo. PM= peso molecular (100 pb); C-NEG= Controle negativo; C-POS= Controle positivo (*Sm* UA159); pb= pares de bases; *Sm*= *Streptococcus mutans*.

Além disso 2 amostras (amostras 06 e 13) de placa dental dos voluntários do grupo controle testaram positivas para *S. mutans* (11,8%; 2/17) (Tabela 10). A análise do DNA de 95 isolados bacterianos (5-15 isolados por indivíduo), obtidos a partir do plaqueamento das 17 amostras de placa dental dos voluntários em meio seletivo, possibilitou a identificação de 5 isolados positivos para *S. mutans* da amostra 06 (Tabela 10) e (Figura 5). No entanto todos os isolados da amostra 13 ($n= 15$ isolados) testaram negativos para *S. mutans* (Tabela 10).

Tabela 10 – A identificação de *S. mutans*, sorotipos e genes *cnm* e *cbm* das amostras analisadas dos voluntários do grupo controle

Identificação de <i>S. mutans</i>			Sorotipos		Genes (<i>cnm</i> / <i>cbm</i>)
Código das amostras	Placa dental (<i>n</i> = 17)	Isolados bacterianos (<i>n</i> = 95)	Placa dental (<i>n</i> = 2)	Isolados bacterianos (<i>n</i> = 5)	Placa dental/ Isolados bacterianos
06	Positivo	5 positivos (*5/5)	<i>c</i>	<i>c</i>	Ausentes
13	Positivo	NE (*0/15)	<i>c</i>	NE	Ausentes

Fonte: elaborada pelo autor.

NE = não encontrado; *proporção de isolados positivos para *S. mutans* dentre os isolados analisados de cada indivíduo.

A sorotipagem das amostras de placa dental positivas para *S. mutans* dos pacientes infartados revelou a presença do sorotipo *c* (amostras 16, 26 e 31), sorotipo *e* (amostras 09 e 13) e sorotipo *k* (amostra 26) (Tabela 9). No entanto o sorotipo *c* foi o único identificado nas amostras de placa dental positivas para *S. mutans* dos voluntários do grupo controle (amostras 06 e 13) (Tabela 10).

Além disso a sorotipagem dos isolados bacterianos positivos para *S. mutans* dos infartados (*n*= 30 isolados) (Tabela 9) e controles (*n*= 5 isolados) (Tabela 10), obtidos a partir do plaqueamento das amostras de placa dental em meio seletivo, identificou a presença dos sorotipos *c* (Figura 6), *e* (Figura 7) e *k* (Figura 8) nos portadores de *S. mutans*.

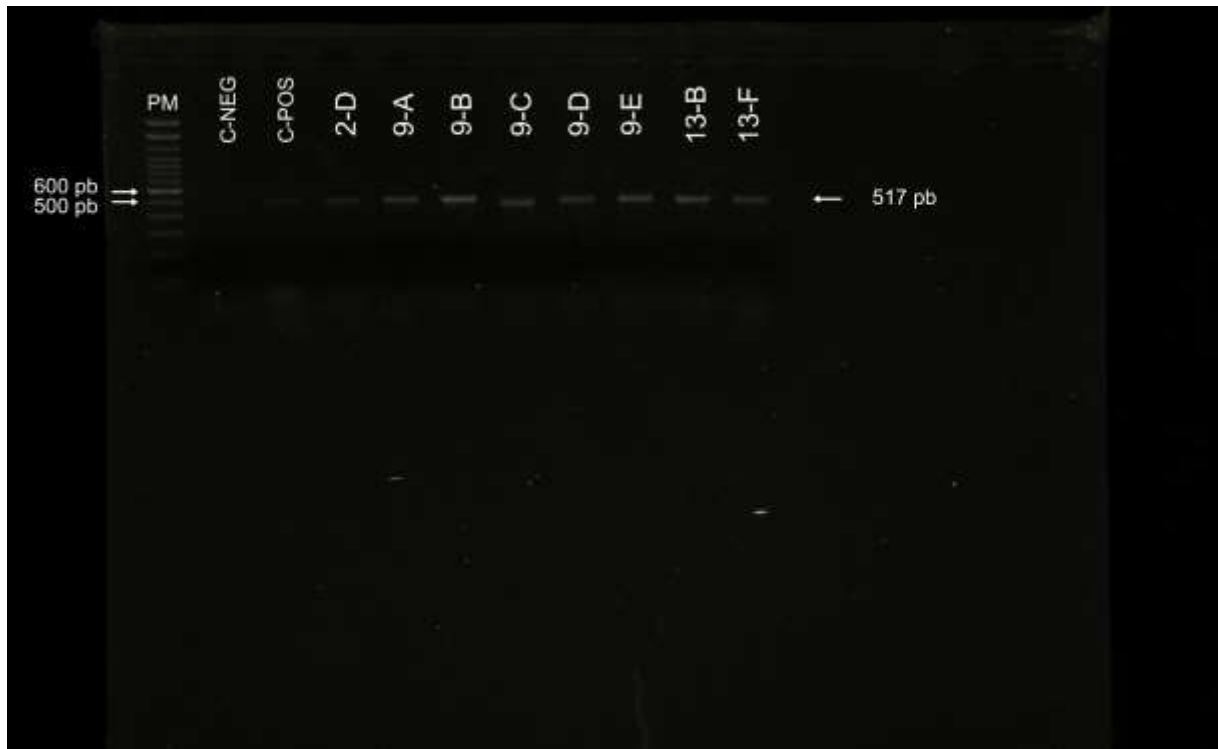
Figura 6 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para o sorotipo *c*



Fonte: elaborada pelo autor.

Géis de agarose a 1,5 % contendo fragmentos amplificados de *S. mutans* do sorotipo *c* dos grupos: a) infartado (16A-26A); b) infartado (31A-31E) e controle (6A-6E). A seta à direita indica fragmentos de 727 pb amplificados da região do loci *rgp* (*rgpF* - ORF12) do sorotipo *c*. O loci *rgp* (*rgpF* - ORF12) é a região responsável pela formação da cadeia lateral de glicose do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular bacteriana. PM= peso molecular (100 pb); C-NEG= Controle negativo; C-POS= Controle positivo (*Sm* UA159); pb= pares de bases; *Sm*= *Streptococcus mutans*.

Figura 7 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental dos pacientes infartados positivos para sorotipo *e*



Fonte: elaborada pelo autor.

Gel de agarose a 1,5 % contendo fragmentos amplificados de *S. mutans* do sorotipo *e* do grupo infartado (2D-13F). A seta à direita indica fragmentos de 517 pb amplificados da região do loci *rgp* (*rgpF* - ORF12) do sorotipo *e*. O loci *rgp* (*rgpF* - ORF12) é a região responsável pela formação da cadeia lateral de glicose do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular bacteriana. PM= peso molecular (100 pb); C-NEG= Controle negativo; C-POS= Controle positivo (*Sm* NN2002); pb = pares de bases; *Sm*= *Streptococcus mutans*.

Figura 8 – Os resultados da PCR dos isolados bacterianos da placa dental do paciente infartado positivos para sorotipo *k*



Fonte: elaborada pelo autor.

Gel de agarose a 1,5 % contendo fragmentos amplificados de *S. mutans* do sorotipo *k* do grupo infartado (26B-26N). A seta à direita indica fragmentos de 294 pb amplificados do gene-alvo (*rgpF*). PM= peso molecular (100 pb); C-NEG= Controle negativo; C-POS= Controle positivo (*Sm* YT1); pb= pares de bases; *Sm*= *Streptococcus mutans*.

No geral, o sorotipo *c* foi identificado em 57,1% (4/7), o *e* em 42,9% (3/7) e o *k* em 14,3% (1/7) das amostras analisadas dos pacientes infartados portadores de *S. mutans* (Tabela 9). Além disso o sorotipo *c* foi detectado em 100% (2/2) das amostras analisadas dos voluntários do grupo controle portadores de *S. mutans* (Tabela 10). Importante, os sorotipos raros (*e* ou *k*) e múltiplos sorotipos (*c* e *k*), comumente associados às doenças cardiovasculares, foram identificados em 57,1% (4/7) e 14,3% (1/7) das amostras analisadas dos pacientes infartados portadores de *S. mutans*, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 – Os fatores de risco, parâmetros bioquímicos, sorotipos, genes *cnm* e *cbm* e perfil de cárie dos pacientes infartados portadores de *S. mutans*

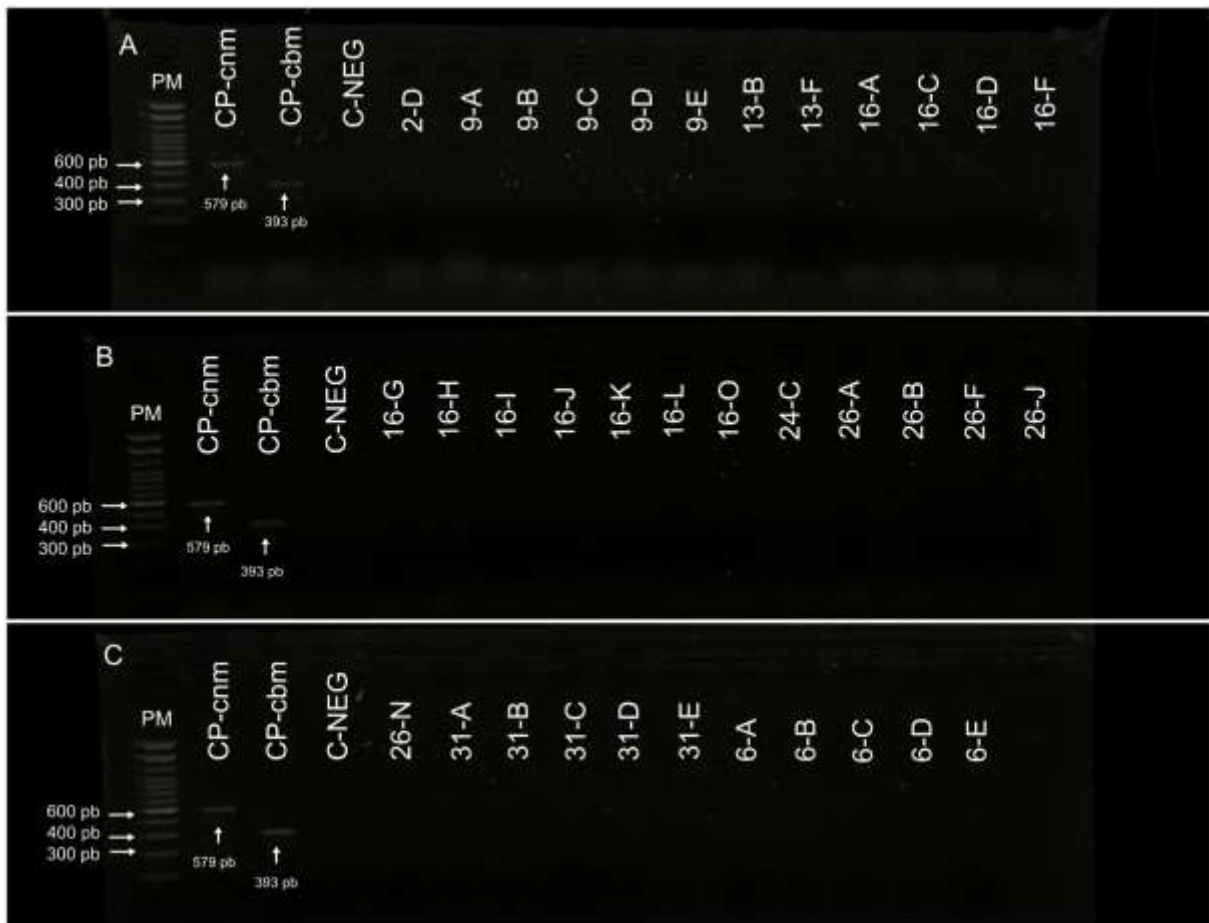
Portadores de <i>S. mutans</i>	Fatores de risco	Parâmetros de normalidade (mg/dL)					Sorotipos	Genes	Cárie	
		GL (< 100)	CT (< 190)	HDL-c (> 40)	LDL-c (< 130)	TG (< 150)		<i>cnm/cbm</i>	Esmalte	Dentina
02	Diabetes	90	104	29	59	80	<i>e</i>	Ausentes	Sim	Sim
09	Tabagismo	223	107	37	72	89	<i>e</i>	Ausentes	Sim	Não
13	Tabagismo	93	365	54	299	59	<i>e</i>	Ausentes	Não	Não
16	Não	77	138	33	91	68	<i>c</i>	Ausentes	Sim	Não
24	Dislipidemia e HFDAC	81	204	37	127	200	<i>c</i>	Ausentes	Sim	Sim
26	Não	84	194	37	146	165	<i>c e k</i>	Ausentes	Sim	Não
31	Dislipidemia	96	158	30	108	84	<i>c</i>	Ausentes	Sim	Não
Média ± DP	-	106,3 ± 51,9	181,4 ± 89,7	36,7 ± 8,3	128,8 ± 80,8	106,4 ± 53,9				

Fonte: elaborada pelo autor.

GL, glicose; CT, colesterol total; HDL-c, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; TG, triglicérides; HFDAC, história familiar de doença arterial coronariana prematura.

No entanto as reações para identificação dos genes *cnm* e *cbm* das amostras de placa dental positivas para *S. mutans* dos infartados (Tabela 9) e controles (Tabela 10) não amplificaram bandas de DNA específicas para os genes mencionados. Além disso as reações para identificação dos genes *cnm* e *cbm* dos isolados da placa dental positivos para *S. mutans* dos infartados ($n= 30$ isolados) e controles ($n= 5$ isolados) não amplificaram bandas de DNA específicas para os genes de proteínas de ligação ao colágeno (Figura 9). Portanto os genes *cnm* e *cbm* não foram encontrados nas amostras analisadas.

Figura 9 – Os resultados da PCR para detecção dos genes *cnm* e *cbm* dos isolados bacterianos da placa dental dos infartados e controles positivos para *S. mutans*



Fonte: elaborada pelo autor.

Géis de agarose a 1,5 % ilustrando a ausência de amplificação dos genes *cnm* e *cbm* dos isolados da placa dental positivas para *S. mutans* dos grupos: a) infartado (2D-16F); b) infartado (16G-26J); c) infartado (26N-31E) e controle (6A-6E). PM= Marcador (100 pb); C-NEG= Controle negativo; C-POS= Controle positivo (*Sm* OMZ175, *cnm*⁺ - 579 pb; *Sm* YT1, *cbm*⁺ - 393 pb); pb= pares de bases; *Sm*= *Streptococcus mutans*.

Com o objetivo de correlacionar a presença de *S. mutans* em amostras de placa dental com a cárie dentária na população estudada, foi realizado o teste do qui-quadrado que faz a comparação de frequências entre grupos considerando as variáveis categóricas. Assim foi possível observar que a presença de *S. mutans* nas amostras analisadas, independente do sorotipo, não foi associada à cárie dentária na população avaliada, independente da condição cardíaca ($p = 0,885$), infartados ($p = 0,853$) e controles ($p = 0,787$). Semelhantemente, a presença de *S. mutans* nas amostras analisadas, independente do sorotipo, não foi associada à cárie em esmalte ($p = 0,536$) e dentina ($p = 0,256$) nos pacientes infartados (Tabela 12).

Tabela 12 – A relação da presença de *S. mutans* (independente do sorotipo) com a cárie dentária na população estudada

Variáveis	A relação da presença <i>S. mutans</i> (independente do sorotipo)				TOTAL	<i>p</i> [†]
	SIM		NÃO			
	N	%	N	%		
Com cárie na população avaliada (independente da condição cardíaca)						
Sim	7	14,6%	28	58,3%	35	0,885
Não	2	4,2%	11	22,9%	13	
Com cárie nos pacientes infartados						
Sim	6	19,4%	19	61,3%	25	0,853
Não	1	3,2%	5	16,1%	6	
Com cárie nos voluntários do grupo controle						
Sim	1	5,9%	9	52,9%	10	0,787
Não	1	5,9%	6	35,3%	7	
Com cárie em esmalte nos pacientes infartados						
Sim	6	19,4%	17	54,8%	23	0,536
Não	1	3,2%	7	22,6%	8	
Com cárie em dentina nos pacientes infartados						
Sim	2	6,5%	10	32,3%	12	0,256
Não	5	16,1%	14	45,2%	19	

Fonte: elaborada pelo autor.

[†]Qui-quadrado de Pearson.

Do mesmo modo, os sorotipos identificados nas amostras analisadas não foram associados à cárie em esmalte ($p = 0,386$) e dentina ($p = 0,801$) nos pacientes infartados (Tabela 13).

Tabela 13 – A relação da presença dos sorotipos de *S. mutans* com a cárie em esmalte e dentina nos pacientes infartados

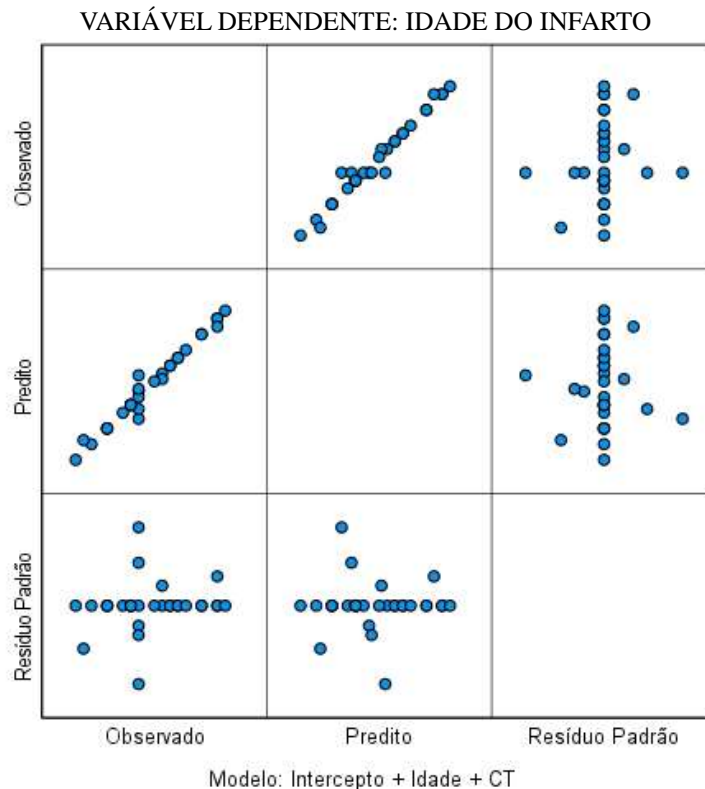
Variáveis	A relação da presença dos sorotipos						TOTAL	p^\dagger
	<i>c</i>		<i>e</i>		<i>k</i>			
	*N	%	N	%	N	%		
Com cárie em esmalte nos pacientes infartados								
Sim	4	50,0%	2	25,0%	1	12,5%	7	0,386
Não	0	0,0%	1	12,5%	0	0,0%	1	
Com cárie em dentina em pacientes infartados								
Sim	1	12,5%	1	12,5%	0	0,0%	2	0,801
Não	3	37,5%	2	25,0%	1	12,5%	6	

Fonte: elaborada pelo autor.

† Qui-quadrado de Pearson. * O N do estudo não permite confiar no teste, pois há grupos com a contagem esperada $< 5,0$.

Além disso com o objetivo de correlacionar os níveis de colesterol com a idade na ocasião do infarto, controlado pela idade na ocasião da coleta de placa dental, foi realizada uma ANCOVA que avalia a relação entre duas variáveis quantitativas sem o efeito de uma covariável. A ANCOVA revelou que há efeito da idade na ocasião da coleta de placa dental (covariável) sobre a idade na ocasião do infarto (variável dependente) [$F(1,26) = 7,236$; $p < 0,05$]. Dessa forma, há efeito dos níveis de colesterol sérico (variável independente) sobre a idade na ocasião do infarto (variável dependente), após controle para o efeito da idade na ocasião da coleta de placa dental (covariável) sendo $F(1,26) = 3,403$; $p < 0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – A ANCOVA do colesterol sérico e idade na ocasião do infarto



Fonte: elaborado pelo autor.

A ANCOVA foi realizada ajustando as variáveis idade no infarto (variável dependente) e colesterol sérico (variável independente) sem a influência da idade na data da coleta da placa dental (covariável). O gráfico indica uma relação linear ($p < 0,05$) entre o colesterol sérico e a idade no infarto quando controlado pela idade na data da coleta da placa dental.

Realizou-se, assim, uma regressão logística binária para verificar se a presença de *S. mutans* e os níveis de colesterol são previsores do desenvolvimento de infarto na população estudada. A análise de regressão mostrou que a presença de níveis normais de colesterol teve efeito significativo sobre os não portadores de *S. mutans*, com estes apresentando uma probabilidade 47,4% menor de infarto (OR = 0,474; IC95% = 0,956-0,992).

De acordo com a diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017), da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as dislipidemias podem ser classificadas com base na fração lipídica alterada em: hipercolesterolemia isolada- aumento isolado do LDL-c (LDL \geq 160 mg/dL); hipertrigliceridemia isolada- aumento isolado dos triglicérides (TG \geq 150 mg/dL); hiperlipidemia mista- aumento do LDL-c (LDL \geq 160 mg/dL) e dos triglicérides (TG \geq 150 mg/dL); HDL-c baixo: redução do HDL-c ($<$ 40 mg/dL) isolado ou em associação ao aumento de LDL-c ou de triglicérides. Neste estudo, 74,3% dos pacientes infartados apresentaram o HDL-c abaixo do desejável. Logo buscou-se analisar se havia diferença de frequência dos distúrbios lipídicos entre os infartados e os não infartados.

Observou-se, portanto, que os indivíduos com HDL-c baixo têm maior tendência ao infarto, enquanto os níveis lipídicos normais protegem contra o infarto, pois $\chi^2(4) = 19,992$; $p = 0,001$ ($p < 0,05$), com uma associação de 62,5%.

6 DISCUSSÃO

A bactéria *S. mutans* é amplamente associada à cárie dentária (LOESCHE, 1986; PITTS *et al.*, 2017). Embora a sua prevalência e incidência tenham permanecidas estáveis ao longo dos últimos anos, a cárie dentária é uma das doenças mais prevalentes e onerosas para o sistema de saúde global (IHEOZOR-EJIOFOR *et al.*, 2015; LISTL *et al.*, 2015; KASSEBAUM *et al.*, 2017). Além do notável potencial cariogênico, a literatura médica tem reportado a presença dessa bactéria em placa dental, valvas cardíacas e placas de ateroma de pacientes submetidos a cirurgias cardiovasculares, sugerindo o possível envolvimento de *S. mutans* na etiopatogênese da aterosclerose e, conseqüentemente, no IAM (KOZAROV *et al.*, 2006; NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014).

Neste estudo, *S. mutans* foi identificado em 22,6% (7/31) e 11,8% (2/17) das amostras analisadas (placa dental e isolados bacterianos da placa dental) dos infartados e controles, respectivamente. Os estudos prévios detectaram a presença de *S. mutans* em 95,1% (39/41) e 100% (13/13) das amostras orais coletadas previamente à realização de cirurgias cardiovasculares (NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014). Por conseguinte, a menor prevalência de *S. mutans* observada neste estudo pode ser atribuída a uma possível melhoria das práticas de higiene bucal, uma vez que as amostras de placa dental foram coletadas após a ocorrência do IAM e de orientações aos pacientes acerca da potencial associação entre a saúde oral e cardiovascular.

Com base na composição química do polissacarídeo de ramnose-glicose da parede celular, específico de cada sorotipo, *S. mutans* foi classificado em quatro sorotipos clínicos (*c*, *e*, *f* e *k*) (NAKANO; OOSHIMA, 2009). As pesquisas empregando as técnicas de imunodifusão e PCR mostraram que o sorotipo *c* é o mais prevalente (70-80%) na cavidade oral, seguido pelos sorotipos *e* (~20%), *f* (<5%) e *k* (2-5%) (NAKANO; OOSHIMA, 2009; LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009). No entanto variações na prevalência dos sorotipos foram reportadas entre diferentes populações e amostras pesquisadas (SWEDAN; OBEIDAT; SHAKHATREH, 2018; MOMENI *et al.*, 2019; ROSERO *et al.*, 2020).

Este estudo empregou a técnica da PCR e determinou a prevalência dos sorotipos *c* (57,1%), *e* (42,9%) e *k* (14,3%) em amostras (placa dental e isolados bacterianos da placa dental) de pacientes infartados portadores de *S. mutans*, porém o sorotipo *f* não foi detectado. Utilizando essa mesma abordagem, Nakano *et al.* (2007) demonstraram uma prevalência semelhante do sorotipo *c* (59,0%) em placa dental de pacientes cardiopatas. O estudo também reportou uma alta prevalência dos sorotipos *e* e *k* em placa dental (84,7% e 15,4%) e placas de

ateroma (62,5% e 25,1%) de pacientes cardiopatas, ao contrário do sorotipo *c* que prevaleceu em amostras orais de indivíduos saudáveis corroborando com os achados deste estudo (NAKANO *et al.*, 2007). Portanto o conhecimento da distribuição dos sorotipos é de relevância para saúde, pois os sorotipos menos prevalentes, em particular os sorotipos *e* e *k*, predominaram em indivíduos afetados por doenças cardíacas (NAKANO *et al.*, 2007; NAKANO; OOSHIMA, 2009).

Em relação ao número de sorotipos presentes nas amostras analisadas (placa dental e isolados da placa dental) dos pacientes infartados, 85,7% (6/7) dos portadores de *S. mutans* tinham um único sorótipo, enquanto um indivíduo (14,3%; 1/7) abrigava dois sorotipos (*c* e *k*). Este achado é semelhante aos observados em populações da Jordânia, Estados Unidos e Espanha (SWEDAN; OBEIDAT; SHAKHATREH, 2018; MOMENI *et al.*, 2019; ROSERO *et al.*, 2020). No entanto diverge da tendência observada no Japão e Tailândia onde predominou a detecção simultânea dos sorotipos *c* e *e* nas populações estudadas (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009). Vale citar que múltiplos sorotipos foram mais frequentes em indivíduos afetados por doenças cardíacas ou que foram submetidos a cirurgias cardiovasculares (NAKANO *et al.*, 2007).

Em adição quatro isolados obtidos da placa dental de um paciente portador de *S. mutans* (14,3; 1/7) que infartou aos 48 anos, sem comorbidades, foram confirmados como pertencentes ao sorotipo *k*. As cepas do sorotipo *k* foram isoladas pela primeira vez do sangue de indivíduos com bacteremia e caracterizadas por uma redução drástica na quantidade de cadeias laterais de glicose do polímero de ramnose da parede celular (FUJIWARA *et al.*, 2001). Acredita-se que *S. mutans* pode acessar a corrente sanguínea via traumas ocasionados por procedimentos odontológicos (SEYMOUR *et al.*, 2000). Outra propriedade, por vezes, comum ao sorotipo *k* é a ausência de expressão da proteína ligante de glucano do tipo A (GbpA) que resultou em baixos níveis de adesão dependente da sacarose e capacidade de ligação ao glucano (LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009; NAKANO *et al.*, 2010). Além disso a ausência de expressão do antígeno PA, baixa hidrofobicidade celular e maior resistência à fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares são atributos de virulência comuns às cepas do sorotipo *k* e estão associados à virulência sistêmica (NAKANO *et al.*, 2004a; NAKANO *et al.*, 2008b; LAPIRATTANAKUL *et al.*, 2009).

Ademais a significância clínica de *S. mutans* na doença sistêmica tem sido associada à presença de duas proteínas de ligação ao colágeno, Cnm e Cbm, codificadas pelos genes *cnm* e *cbm*, respectivamente (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.*, 2012a). Essas proteínas são expressas em maior frequência nos sorotipos menos prevalentes (*e*, *f* e *k*)

(NOMURA *et al.*, 2012a; AVILÉS-REYES *et al.*, 2016). Assim estudos mostraram que as cepas de *S. mutans* apresentam maior afinidade de ligação às proteínas da matriz extracelular, como o colágeno do tipo I, e maior potencial de colonização da polpa dentária e canais radiculares quando expressam as proteínas Cnm e/ou Cbm (SATO *et al.*, 2004; NOMURA *et al.*, 2012a; NOMURA; OGAYA; NAKANO, 2016; LIMA *et al.*, 2020). Importante, as cepas Cnm e Cbm positivas apresentaram maior potencial de invasão e sobrevivência no citoplasma de células endoteliais de artérias coronárias humanas (ABRANCHES *et al.*, 2009; ABRANCHES *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2020). Além disso, em modelo animal, autores demonstraram que a cepa OMZ175 (*cnm*⁺) acelerou o aumento da resposta inflamatória e a formação de placa aterosclerótica, principal causa do IAM (KESAVALU *et al.*, 2012; THYGESSEN *et al.*, 2018). Contudo, neste estudo, os genes *cnm* e *cbm* não foram encontrados nas amostras analisadas (placa dental e isolados bacterianos da placa dental). Futuras pesquisas com amostras de diferentes sítios, como de lesões cavitadas, com exposição de tecido dentinário e pulpar, e de infecções endodônticas poderão elucidar a distribuição e prevalência desses genes em *S. mutans* no Brasil, uma vez que as cepas que expressam as proteínas Cnm e Cbm têm predileção pelos tecidos ricos em colágeno (NOMURA; OGAYA; NAKANO, 2016; LIMA *et al.*, 2020).

A presença de *S. mutans*, independente do sorotipo, não foi associada à cárie dentária na população estudada. A prevalência de *S. mutans* nos infartados e controles foi de 22,6% e 11,8%, respectivamente. A baixa prevalência de *S. mutans* pode ser atribuída a uma possível melhoria das práticas de higiene bucal e ao sítio de coleta das amostras de placa dental. Futuras pesquisas, com amostras de placa dental coletadas da superfície de dentes hígidos e de lesões de cárie cavitadas, poderão estabelecer uma tendência divergente já que *S. mutans* é uma bactéria associada à doença cárie (LOESCHE, 1986; PITTS *et al.*, 2017).

De acordo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, o HDL-c baixo (< 40 mg/dL), isolado ou em associação ao aumento de LDL-c ou de triglicérides, é utilizado na classificação das dislipidemias (FALUDI *et al.*, 2017). Neste estudo, 74,3% dos pacientes infartados apresentaram o HDL-c abaixo do desejável de acordo com a classificação citada. A análise da frequência dos distúrbios lipídicos na população estudada mostrou que os indivíduos com HDL-c baixo têm maior tendência ao infarto, enquanto os níveis lipídicos normais protegem contra o infarto, com 62,5% de associação entre as variáveis. Vale ressaltar que o HDL-c baixo é um fator de risco para a doença arterial coronariana (LÜSCHER *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2019).

A análise de regressão mostrou que os indivíduos com níveis normais de colesterol e sem *S. mutans* apresentaram uma probabilidade 47,4% menor de infarto. Na maioria dos casos,

o IAM é precedido da ruptura ou erosão de uma placa coronária aterosclerótica (BOATENG; SANBORN, 2013; ANDERSON; MORROW, 2017). Em geral, a destruição do esmalte e da dentina, em decorrência de lesões de cárie avançadas, resulta na exposição dos capilares sanguíneos da polpa dentária permitindo que bactérias orais (incluindo *S. mutans*) acessem a corrente sanguínea (NAKANO *et al.*, 2006b; MISAKI; FUKUNAGA; NAKANO, 2021). Assim estudos apontaram que infecções por bactérias periodontais e cariogênicas estariam associadas ao desenvolvimento e progressão da aterosclerose (PUCAR *et al.*, 2007; KOZAROV *et al.*, 2006; NAKANO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2014). Com isso, autores propuseram quatro mecanismos patogênicos básicos envolvendo infecções orais na patogênese da aterosclerose: (1) bacteremia e invasão da parede arterial; (2) indução de inflamação sistêmica pela produção e liberação de mediadores inflamatórios dos locais da infecção oral na corrente sanguínea; (3) resposta imune do hospedeiro a componentes específicos de bactérias orais e (4) efeitos pró-aterogênicos de toxinas bacterianas específicas. No entanto futuros estudos são necessários para comprovar esses mecanismos (AARABI; HEYDECKE; SEEDORF, 2018; MISAKI; FUKUNAGA; NAKANO, 2021; LIU *et al.*, 2020).

Uma vez que esta pesquisa utilizou um número pequeno de amostras, os autores sugerem a realização de futuros estudos em larga escala com amostras de diferentes sítios de coleta para investigar a prevalência dos sorotipos e genes de virulência de *S. mutans* em indivíduos saudáveis e diagnosticados com cardiopatias, incluindo crianças. Acredita-se que isso resultará em dados mais representativos e facilitará a identificação de possíveis associações de sorotipos e genes de virulência a doenças orais e sistêmicas na população brasileira.

O presente estudo apresenta algumas limitações como uso de uma amostra de conveniência com um número amostral pequeno cujas amostras de placa dental foram coletadas em tempos variáveis após o evento infarto. Em adição não foram acessadas informações sobre padrão alimentar ou de higienização que são fatores fortemente associados à presença de lesões de cárie dentária e podem estar associados à presença de *S. mutans*. No entanto, como o IAM é um evento não frequente em pacientes adultos antes dos 50 anos de idade, o recrutamento foi dificultado.

7 CONCLUSÃO

S. mutans foi identificado em 22,6% e 11,8% das amostras analisadas dos infartados e controles, respectivamente.

Os sorotipos raros e múltiplos sorotipos foram identificados somente nas amostras de placa dental dos pacientes infartados. O sorotipo *c* foi o único identificado nas amostras de placa dental dos controles.

Os genes *cnm* e *cbm* não foram encontrados nas amostras analisadas dos infartados e controles.

A relação de *S. mutans* com cárie dentária não foi significativa na população estudada.

Os níveis séricos normais de colesterol em não portadores de *S. mutans* foram relacionados com uma probabilidade 47,4% menor de infarto.

REFERÊNCIAS

- AARABI, G.; HEYDECKE, G.; SEEDORF, U. Roles of oral infections in the pathomechanism of atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 1978, 2018.
- ABRANCHES, J. *et al.* Invasion of human coronary artery endothelial cells by *Streptococcus mutans* OMZ175. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 141-145, 2009.
- ABRANCHES, J. *et al.* The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 2277-2284, 2011.
- AJDIĆ, D. *et al.* Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- ANDERSON, J. L.; MORROW, D. A. Acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 376, n. 21, p. 2053-2064, 2017.
- AOKI, H. *et al.* Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 587-594, 1986.
- ARGIMÓN, S. *et al.* Comparative genomics of oral isolates of *Streptococcus mutans* by in silico genome subtraction does not reveal accessory DNA associated with severe early childhood caries. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 21, p. 269-278, 2014.
- ASPIRAS, M. B.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. ComX activity of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 238, n. 1, p. 167-174, 2004.
- ATHANASIOU, L.; FOTIADIS, D.; MICHALIS, L. **Atherosclerotic plaque characterization methods based on coronary imaging**. [s. l.]: Academic Press, 2017.
- AVILÉS-REYES, A. *et al.* Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 89-106, 2016.
- BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral Streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.
- BEG, A. M. *et al.* Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 298, n. 1, p. 75-79, 2002.
- BISWAS, S. *et al.* SepM, a Streptococcal protease involved in quorum sensing, displays strict substrate specificity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 198, n. 3, p. 436-447, 2016.
- BOATENG, S.; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Disease-A-Month**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 83-96, 2013.

BOWEN, W. *et al.* Oral Biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 229-242, 2018.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011.

BRADY, L. J. *et al.* The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 276-286, 2010.

BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. **Odontologisk revy**, Malmö, v. 21, n. 2, p. 143-152, 1970.

CAHILL, T. J.; PRENDERGAST, B. D. Infective endocarditis. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10021, p. 882-893, 2016.

CLARKE, J. K. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. **The British Journal of Experimental Pathology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 141-147, 1924.

COLE, W. G. *et al.* Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. **Biochemical Journal**, Londres, v. 219, n. 2, p. 451-460, 1984.

CORNEJO, O. E. *et al.* Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 881-893, 2013.

CURY, J. A. *et al.* Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dental Materials**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 323-333, 2016.

CVITKOVITCH, D. G.; LI, Y-H.; ELLEN, R. P. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 112, n. 11, p. 1626-1632, 2003.

DOERN, C. D.; BURNHAM, C. A. It's not easy being green: the viridans group Streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 11, p. 3829-3835, 2010.

ESBERG, A. *et al.* *Streptococcus mutans* adhesin biotypes that match and predict individual caries development. **Ebiomedicine**, [s. l.], v. 24, p. 205-215, out. 2017.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 182-191, 2004.

FENG, M. *et al.* Free cholesterol transfer to high-density lipoprotein (HDL) upon triglyceride lipolysis underlies the U-shape relationship between HDL-cholesterol and cardiovascular

disease. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], v. 27, n. 15, p. 1606-1616, 2019.

FERNANDES, C. P. *et al.* Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 174, n. 3, p. 710-712, 2014.

FLEMMING, H-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

FRASER-LIGGETT, C. M. Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. **Genome Research**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1603-1610, 2005.

FUJIWARA, T. *et al.* Biochemical and genetic characterization of serologically untypable *Streptococcus mutans* strains isolated from patients with bacteremia. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 5, p. 330-334, 2001.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; HOUTE, J. V. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 18, p.1357–1364, 1973.

HAN, T. K.; ZHANG, C.; DAO, M. L. Identification and characterization of collagen-binding activity in *Streptococcus mutans* wall-associated protein: a possible implication in dental root caries and endocarditis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 343, n. 3, p. 787-792, 2006.

HANADA, N.; KURAMITSU H. K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, p. 2079-2085, 1989.

HANADA, N.; KURAMITSU, H. K. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* *gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, p. 1999-2005, 1988.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. K.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annual Review of Pathology**, [s. l.], v. 1, p. 297–329, 2006.

HARASZTHY, V. I. *et al.* Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 1554-1560, 2000.

HO, S. P. *et al.* The tooth attachment mechanism defined by structure, chemical composition and mechanical properties of collagen fibers in the periodontium. **Biomaterials**, [s. l.], v. 28, n. 35, p. 5238-5245, 2007.

IHEOZOR-EJIOFOR, Z. *et al.* Water fluoridation for the prevention of dental caries. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, 6:CD010856, 2015.

INENAGA, C. *et al.* Potential new risk factor for stroke: *Streptococcus mutans* with collagen-binding protein. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 113, p. 77-81, 2018.

ISMAIL, A. I. *et al.* The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an

integrated system for measuring dental caries. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 170-178, 2007.

ITO, S. *et al.* Specific strains of *Streptococcus mutans*, a pathogen of dental caries, in the tonsils, are associated with IgA nephropathy. **Scientific Reports**, [s. l.], n. 9, 2019.

KASSEBAUM, N. J. *et al.* Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

KESAVALU, L. *et al.* Increased atherogenesis during *Streptococcus mutans* infection in ApoE-null mice. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 255-260, 2012.

KILIAN, M. *et al.* The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. **British Dental Journal**, [s. l.], v. 221, p. 657-666, 2016.

KIM, S. L.; GORDON, S. M.; SHRESTHA, N. K. Distribution of streptococcal groups causing infective endocarditis: a descriptive study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 269-272, 2018.

KLEIN, M. I. *et al.* *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 10, 2015.

KOGA, T. *et al.* Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 2, p. 289-296, 1990.

KOJIMA, A. *et al.* Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative. **Scientific Reports**, [s. l.], n. 2, 2012.

KOZAROV, E. *et al.* Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 687-693, 2006.

KURAMITSU, H. K. *et al.* Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. **Annals of Periodontology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 41-47, 2001.

LAMBA, G. S. *et al.* Association of *Streptococcus mutans* collagen binding genes with severe childhood caries. **Clinical Oral investigations**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 3467-3475, 2020.

LAPIRATTANAKUL, J. *et al.* Detection of serotype k *Streptococcus mutans* in Thai subjects. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 431-433, 2009.

LEMBO, F. L. *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 313-319, 2007.

LEMOES, J. A. *et al.* The biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2019.

- LEUNG, V.; LEVESQUE, C. M. A Stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 9, p. 2265-2274, 2012.
- LI, Y. H. *et al.* A Quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 10, p. 2699-2708, 2002.
- LI, Y. H. *et al.* Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 23, 6875-6884, 2001b.
- LI, Y. H. *et al.* Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 3, p. 897-908, 2001a.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, [s. l.], v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.
- LIMA, A. R. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 12, p. 1876-1883, December 2020.
- LINZER, R.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Immunochemical aspects of serotype carbohydrate antigens of *Streptococcus mutans*. In: HAMADA, S. *et al.* **Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans***. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986. p. 29-38.
- LISTL, S. *et al.* Global economic impact of dental diseases. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 94, n. 10, p. 1355-1361, 2015.
- LIU, X. R. *et al.* Role of oral microbiota in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 506, p. 191-195, 2020.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 50, n. 4, 353-380, 1986.
- LÜSCHER, T. F. *et al.* High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. **Circulation Research**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 171-182, 2014.
- MARSH, P. D. Dental diseases-are these examples of ecological catastrophes? **International Journal of Dental Hygiene**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3-10, 2006.
- MASHBURN-WARREN, L.; MORRISON, D. A.; FEDERLE, M. J. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 589-606, 2010.
- MATSUMOTO-NAKANO, M. Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. **Japanese Dental Science Review**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 22-29, 2018.

- MATSUMOTO-NAKANO, M.; FUJITA, K.; OOSHIMA, T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 30-35, 2007.
- MENG, P. *et al.* Exploring the genomic diversity and cariogenic differences of *Streptococcus mutans* strains through pan-genome and comparative genome analysis. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 10, p. 1200-1209, 2017.
- MERRITT, J. *et al.* Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1972-1979, 2003.
- MICHAEL, S. F. *et al.* Investigating the candidacy of the serotype specific rhamnan polysaccharide based glycoconjugates to prevent disease caused by the dental pathogen *Streptococcus mutans*. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 53-64, 2018.
- MILLER, J. H. *et al.* The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. **Infection and Immunity**, Washington, v. 83, n. 5, p. 2001-2010, 2015.
- MISAKI, T. *et al.* Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the *cnm* gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 36455, 2016.
- MISAKI, T.; FUKUNAGA, A.; NAKANO, K. Dental caries status is associated with arteriosclerosis in patients on hemodialysis. **Clinical and Experimental Nephrology**, n. 25, p. 87-93, 2021.
- MIYATANI, F. *et al.* Relationship between Cnm-positive *Streptococcus mutans* and cerebral microbleeds in humans. **Oral Diseases**, v. 21, n. 7, p. 886-893, 2015.
- MOMENI, S. S. *et al.* *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 64-73, 2019.
- MOREILLON, P.; QUE, Y. A. Infective endocarditis. **The Lancet**, v. 363, n. 9403, p. 139-149, 2004.
- MURDOCH, D. R. *et al.* Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st Century: the international collaboration on endocarditis-prospective cohort study. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 169, n. 5, p. 463-473, 2009.
- NAGATA, E.; TOLEDO, A.; OHO, T. Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 78-88, 2011.
- NAKA, S. *et al.* Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], n. 6, 2016.
- NAKANO, K. *et al.* Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 114-121, 2006a.

- NAKANO, K. *et al.* Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3313-3317, 2006b.
- NAKANO, K. *et al.* Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 198-202, 2004a.
- NAKANO, K. *et al.* Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* Serotype k strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 11, p. 4925-4930, 2004b.
- NAKANO, K. *et al.* Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains containing the *cnm* gene encoding a collagen-binding adhesin. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 34-39, 2010.
- NAKANO, K. *et al.* Protein antigen in Serotype k *Streptococcus mutans* clinical isolates. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 87, n. 10, p. 964-968, 2008b.
- NAKANO, K. *et al.* Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 551-556, 2007.
- NAKANO, K. *et al.* The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. **Nature Communications**, [s. l.], v. 2, n. 485, 2011.
- NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. **Japanese Dental Science Review**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 29-37, 2008a.
- NAKANO, K.; OOSHIMA, T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 891-902, 2009.
- TONOMURA, S. *et al.* Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with *cnm*-positive *Streptococcus mutans*; a hospital cohort study. **Scientific Reports**, [s. l.], n. 6, 2016.
- NOMURA, R. *et al.* Contribution of the Interaction of *Streptococcus mutans* Serotype k strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, n. 12, p. 5223-5234, 2014.
- NOMURA, R. *et al.* Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 308-323, 2012a.
- NOMURA, R. *et al.* Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 469-475, 2009.
- NOMURA, R. *et al.* Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 1627-1634, 2013.

NOMURA, R. *et al.* Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 387-393, 2012b.

NOMURA, R.; OGAYA, Y.; NAKANO, K. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. **Plos One**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2016.

OHO, T. *et al.* Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 258-262, 2000.

OLIVEIRA, F. A. *et al.* Molecular analysis of oral bacteria in heart valve of patients with cardiovascular disease by real-time polymerase chain reaction. **Medicine**, [s. l.], v. 94, n. 47, 2015.

OLIVEIRA, G. M. M. *et al.* Cardiovascular Statistics – Brazil 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 3, p. 308-439, 2020.

ORSINI, G. *et al.* Immunocytochemical detection of dentin matrix proteins in primary teeth from patients with dentinogenesis imperfecta associated with osteogenesis imperfecta. **European Journal of Histochemistry**, [s. l.], v. 58, n. 4:2405, 2014.

OTSUGU, M. *et al.* Contribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the presence of serum to the pathogenesis of infective endocarditis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 85, n. 12, 2017.

PAHWA, R.; JIALAL, I. Atherosclerosis. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

PALMER, S. R. *et al.* Phenotypic heterogeneity of genomically-diverse isolates of *Streptococcus mutans*. **Plos One**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2013.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.

PETERSEN, F. C.; SCHEIE, A. A. Genetic transformation in *Streptococcus mutans* requires a peptide secretion-like apparatus. **Oral Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 329-334, 2000.

PHATTARATARATIP, E. *et al.* *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 187-199, 2011.

PITTS, N. B. *et al.* Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, n. 17030, 2017.

PRITCHARD, D. G. *et al.* Structure of the serotype f polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 123-131, 1987.

- PROCOP, G. W. *et al.* Gram-positive cocci part II: streptococci, enterococci and the 'Streptococcus-like' bacteria. In: LIPPINCOTT, J. B. (ed.). **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017. p. 733-843.
- PUCAR, A. *et al.* Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 677-682, 2007.
- RENKO, J. *et al.* Bacterial signatures in atherosclerotic lesions represent human commensals and pathogens. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 201, n. 1, p. 192-197, 2008.
- RÔÇAS, I. N. *et al.* Advanced caries microbiota in teeth with irreversible pulpitis. **Journal of Endodontics**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1450-1455, 2015.
- ROCHA, F. R. *et al.* Effect of bioactive compounds on the regulation of quorum sensing network-associated genes and virulence in *Streptococcus mutans*: a systematic review. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 119, n. 104893, 2020.
- ROSERO, N. S. *et al.* Molecular and serological typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from young Galician population: relationship with the oral health status. **International Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 589-596, 2020.
- ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.
- RUSSELL, R. R. B.; COLEMAN, D.; DOUGAN, G. Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. **Microbiology**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 295-299, 1985.
- SATO, Y. *et al.* *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 83, n. 7, p. 534-539, 2004.
- SATO, Y.; YAMAMOTO, Y.; KIZAKI, H. Cloning and sequence analysis of the *gbc* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 2, p. 668-675, 1997.
- SANTOS, J. *et al.* Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil e suas regiões geográficas: análise do efeito da idade-período-coorte. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1621-1634, 2018.
- SEYMOUR, R. A. *et al.* Infective endocarditis, dentistry and antibiotic prophylaxis: time for a rethink?. **British Dental Journal**, [s. l.], v. 189, n. 11, p.610-616, 2000.
- SHAH, D. S. H.; RUSSELL, R. R. B. A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, [s. l.], v. 150, n. 6, p. 1947-1956, 2004.
- SHANKER, E.; FEDERLE, M. Quorum sensing regulation of competence and bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 1:15. 2017.

- SHIBATA, Y. *et al.* Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4107-4112, 2003.
- SHIELDS, R. C.; BURNE, R. A. Growth of *Streptococcus mutans* in biofilms alters peptide signaling at the sub-population level. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 1075, 2016.
- SHIN, J. H. Nucleic Acid Extraction Techniques. *In*: TANG, Y. W.; STRATTON, C. (ed.) **Advanced techniques in diagnostic microbiology**. Boston, MA: Springer, 2013. p. 209-225.
- SMITH, D. J. *et al.* Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2545-2552, 1994.
- SMITH, E. G.; SPATAFORA, G. A. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 133-141, 2012.
- STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 69, p. 183-215, 2000.
- SWEDAN, S. F.; OBEIDAT, H. M.; SHAKHATREH, M. A. K. Molecular typing and detection of collagen binding genes among *Streptococcus mutans* isolated from diabetic and non-diabetic individuals in Northern Jordan. **Jordan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 11, n.3, p. 293-300, 2018.
- SZTAJER, H. *et al.* Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the *luxS* mutation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 1, p. 401-415, 2008.
- SZTAJER, H. *et al.* Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 2256-2271, 2014.
- TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BOREN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. **Circulation**, [s. l.], v. 116, n. 16, p. 1832 - 1844. 2007.
- TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. **Caries Research**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 422-431, 2016.
- TETTELIN, H. *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 39:13950-5, 2005.
- THYGESEN, K. *et al.* Fourth universal definition of myocardial infarction. **Circulation**, [s. l.], v. 72, n. 18, p. 2231-2264, 2018.

- TONOMURA, S. *et al.* Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 12, p. 3980-3989, 2005.
- VAN DER PLOEG, J. R. Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 12, p. 3980-3989, 2005.
- VILLHAUER, A. L.; LYNCH, D. J.; DRAKE, D. R. Improved method for rapid and accurate isolation and identification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* from human plaque samples. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 139, p. 205-209, 2017.
- VOGKOU, C. T. *et al.* The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 1227-1245, 2016.
- WATANABE, I. *et al.* Oral Cnm-positive *Streptococcus mutans* expressing collagen binding activity is a risk factor for cerebral microbleeds and cognitive impairment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 38561, 2016.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 319-346, 2005.
- WEN, Z. T. *et al.* Transcriptome analysis of *LuxS*-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms. **Molecular Oral Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 2-18, 2011.
- YUMOTO, H. *et al.* The pathogenic factors from oral streptococci for systemic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 4571, 2019.
- ZHOU, X.; LI, Y. (ed.). Supragingival Microbes. *In*: ZHOU, X.; LI, Y. **Atlas of oral microbiology**. [s. l.]: Elsevier, 2015. p. 41-65.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS SOROTIPOS E DOS GENES *cnm* E *cbm* DE *Streptococcus mutans* ISOLADOS DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA CARDIOVASCULAR.

Pesquisador: FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29466020.1.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.964.967

Apresentação do Projeto:

O *Streptococcus mutans*, um dos agentes etiológicos da cárie dentária mais estudados, possui quatro sorotipos clínicos conhecidos (c, e, f e k). A presença de múltiplos sorotipos e cepas com genes que codificam proteínas de ligação ao colágeno (*cnm* e *cbm*) têm sido associados a doenças sistêmicas. Contudo, estudos sobre a prevalência de sorotipos de *S. mutans* no Brasil não têm sido realizados. Assim, este estudo tem como propósito avaliar a prevalência dos sorotipos de *S. mutans* em amostras de DNA previamente extraído da saliva, placa dental e válvulas cardíacas, e em amostras de DNA extraído a partir do cultivo de placa dental em meio seletivo para *S. mutans*. Trata-se de um estudo do tipo investigação experimental em laboratório ou *in vitro*.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar a prevalência dos sorotipos e genes *cnm* e *cbm* de *S. mutans* em amostras de saliva, placa dental e válvula cardíaca obtidas de pacientes com diagnóstico de doença cardiovascular.

Objetivo Secundário:

Avaliar a relação da prevalência dos sorotipos e genes que codificam proteínas de ligação ao colágeno (*cnm/cbm*) com a presença de lesão e experiência de cárie.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa será realizada com amostras de DNA previamente extraído de saliva, placa dental e

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Telefone: (85)3366-8344

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.964.967

válvulas cardíacas; e com amostras de DNA a ser extraído de microrganismos (*Streptococcus mutans*) presentes em amostras de placa dental previamente coletada, sem adição de riscos aos participantes de pesquisas ou prejuízos ao bem-estar dos mesmos.

Benefícios:

A determinação da prevalência dos sorotipos e dos genes *cnm* e *cbm* de *S. mutans* em amostras de saliva, placa dental e válvulas cardíacas fornecerá elementos que poderão vincular infecções orais a doenças sistêmicas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em questão está bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/2012/CNS/MS que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos está incluída.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do trabalho estão coerentes com o tema abordado e o rigor da ética em pesquisa.

Recomendações:

Descrever os riscos de forma adequada e os teste estatísticos que serão realizados com seu nível de significância.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao final da pesquisa, enviar o relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1517086.pdf	27/02/2020 15:45:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	27/02/2020 15:37:17	FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	27/02/2020 15:36:46	FRANCISCO RULIGLESIO	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.964.967

Outros	CURRICULO_LATES.pdf	27/02/2020 00:30:07	FRANCISCO RULIGLESIO	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_DE_CONCORDANCIA.pdf	27/02/2020 00:28:49	FRANCISCO RULIGLESIO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.pdf	27/02/2020 00:27:55	FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA	Aceito
Cronograma	DECLARACAO_DO_CRONOGRAMA.pdf	27/02/2020 00:27:26	FRANCISCO RULIGLESIO	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CARTA_DE_SOLICITACAO_DE_APRECIACAO_DE_PROJETO.pdf	27/02/2020 00:26:10	FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA	Aceito
Orçamento	DECLARACAO_DE_ORCAMENTO.pdf	27/02/2020 00:25:16	FRANCISCO RULIGLESIO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_DE_FIEL_DEPOSITARIO.pdf	27/02/2020 00:24:55	FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ISENCAO_DO_TERMOS_DE_CONSENTIMENTO.pdf	27/02/2020 00:24:22	FRANCISCO RULIGLESIO ROCHA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 11 de Abril de 2020

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A273C0A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A273C0A**
 Usuário: **Universidade Federal do Ceará**
 CPF/CNPJ: **07.272.636/0001-31**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Streptococcus mutans

Titulo da Atividade: **CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE Streptococcus mutans ISOLADOS DA PLACA DENTAL DE PACIENTES JOVENS COM HISTÓRICO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: FREQUÊNCIA E RELAÇÃO COM O RISCO CARDIOVASCULAR**

Equipe

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage **Universidade Federal do Ceará**
Francisco Ruligliésio Rocha **Universidade Federal do Ceará**

Data do Cadastro: **25/11/2020 23:16:55**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **23:17** de **25/11/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS - QUALIS A1 (NOVO QUALIS)

Archives of Oral Biology 119 (2020) 104893



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio

Review

Effect of bioactive compounds on the regulation of quorum sensing network-associated genes and virulence in *Streptococcus mutans*—A systematic reviewFrancisco R. Rocha^a, Wanessa F.M. Regis^b, Simone Duarte^c, Francisco W.M.G. Muniz^d, Lidiany K.A. Rodrigues^{e,*}^a Department of Pathology and Legal Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Zip Code: 60430-270, Brazil^b Faculty of Pharmacy, Dentistry, and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil^c Department of Cariology, Operative Dentistry and Dental Public Health, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, IN, United States^d Department of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil^e Department of Operative Dentistry, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Zip Code: 60430-170, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Quorum quenching
Competence-stimulating peptide
Dental caries
Biofilms

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to systematically review the literature on the effect of bioactive compounds and their regulation of quorum sensing (QS)-related and/or -regulated-virulence genes expression in *Streptococcus mutans*.**Design:** The search strategy was conducted through the electronic databases Pubmed, Scopus, and Web of Science for studies reporting the effects of natural and synthetic bioactive compounds on the regulation of QS-associated and/or -regulated genes of *S. mutans*.**Results:** After full-text reading, 19 studies met the inclusion criteria, in most of them, QS-inhibitors from synthetic origin were evaluated, 16 articles described the effect of the compounds on biofilm formation cultivated *in vitro* and five studies described these effects on adhesion of biofilm-producing cells. Only 2 studies analyzed the potential target-component of the QS.**Conclusions:** Mostly, the bioactive compounds affected the expression of QS-associated and/or -regulated genes and virulence traits (e.g. adhesion, biofilm formation, acid stress tolerance) of *S. mutans*. Further studies are necessary to elucidate the target-specific QS-system constituent used by bioactive compounds to achieve QS inhibition as well as validate the use of these compounds in controlling dental caries.

1. Introduction

Dental caries is a disease dependent on both biofilm aggregation over the tooth surface and its recurrent exposure to dietary carbohydrates (Fejerskov, 2004). *Streptococcus mutans* is a bacterium highly prevalent in dental biofilms and one of the most studied microorganisms related to dental caries (Krzyszczak, Jureczak, Kościelniak, Bystrowska, & Skalniak, 2014; Loesche, 1986). *S. mutans* exhibit a high degree of virulence, mainly because of its capacity of producing great amounts of organic acids (acidogenicity) from metabolized sugars, surviving at low pH (aciduricity), and synthesizing extracellular polysaccharides substances (EPS) (Bowen & Koo, 2011; Marsh, 2003). These exopolysaccharides are mainly glucans produced by glucosyltransferases (Gtfs) that provide

binding sites for microorganism agglomeration on the tooth surface and formation of pathogenic biofilms (Ren, Chen, Li, & Li, 2016; Scharnow, Solinski, & Wuest, 2019). *S. mutans* Gtfs are classified into three types (GtFB, GtFC, and GtFD), which are encoded by *gtfB*, *gtfC* and *gtfD* genes, respectively (Ren et al., 2016). The GtFB synthesizes mainly water-insoluble glucans (rich in α -1,3-glucosidic linkages), GtFC produces both water-insoluble and water-soluble glucans (rich in α -1,6-glucosidic linkages), GtFD produces water-soluble glucans (Hanada & Kuramitsu, 1988; Aoki, Shiroza, Hayakawa, Sato, & Kuramitsu, 1986; Hanada & Kuramitsu, 1989). Furthermore, *S. mutans* produces multiple glucan-binding proteins (Gbps); GbpA (Russell, Coleman, & Dougan, 1985), GbpB (Smith, Akita, King, & Taulman, 1994), GbpC (Sato, Yamamoto, & Kizaki, 1997), and GbpD (Shah & Russell, 2004), which

* Corresponding author.

E-mail address: lidianykarla@ufc.br (L.K.A. Rodrigues).<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104893>

Received 30 April 2020; Received in revised form 23 August 2020; Accepted 25 August 2020

Available online 31 August 2020

0003-9969/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The Role of *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* Spent Culture Supernatant in Single and Dual-Species Biofilm

Regis WFM, Reis ACM, Rocha FR, Guedes SFF, Maia DCBS and Rodrigues LKA*

Department of Operative Dentistry, Brazil

*Corresponding author: Rodrigues LKA, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Department of Operative Dentistry, Brazil



ARTICLE INFO

Received: February 01, 2019

Published: February 15, 2019

ABSTRACT

Citation: Regis WFM, Reis ACM, Rocha FR, Guedes SFF, Maia DCBS, Rodrigues LKA. The Role of *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* Spent Culture Supernatant in Single and Dual-Species Biofilm. Biomed J Sci & Tech Res 14(4)-2019. BJSTR. MS.ID.002588.

Short Communication

The association of bacteria with fungal species in biofilms can provide substrates, metabolites and growth factors in certain circumstances [1], and these interactions or "communication" mechanisms between distinct species living in biofilms, which occur when microorganisms exchange chemical signals, are known as *quorum sensing* (QS) [2]. Microorganisms within biofilms can also belong to the same species, and the generated signals can freely spread and diffuse across the cell membrane into the medium, thereby orchestrating biofilm formation [3]. The QS molecules which have been found in the spent culture supernatant (SCS) of bacterial and fungal cultures have been noted as regulators of virulence mechanisms related to biofilm formation, especially in pathogenic biofilms [4]. Frequently, *S. mutans* and *C. albicans* are found together in oral biofilms [1]. Thus, considering the polymicrobial characteristic of dental caries, investigating the way that interactions between microbes affect biofilm formation and cell morphology is essential to understanding the pathogenesis of this disease [5]. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of *C. albicans* and *S. mutans* SCS, combined or not, in the biofilm formation of these microorganisms grown in their single-species and dual-species biofilms.

Subjects and Methods

Strains of *C. albicans* (ATCC 10231) and *S. mutans* (UA 159) were grown in YNB and BHI, respectively, for 18 h, at 37 °C under microaerophilic conditions [6]. The microbial cultures were

adjusted to a 0.5 Mc Farland standard (equivalent to 1.5×10^8 CFU/mL) in YNB broth supplemented with 1% glucose (w/v) and BHI broth supplemented with 1% sucrose (w/v), respectively. The microorganisms were inoculated separately into the wells of in microtiter plate and incubated at 37 °C (5% CO₂) for 48 h, with culture medium replaced every day. After this period, for SCS obtainment, the biofilms were centrifuged at 1,300 rpm (NT-835, Novatecnica, Piracicaba, SP, Brazil) and SCS filtered with 0.22-µm membranes filters as previously described [7,8]. The single and dual-species biofilms were grown *in vitro* in the presence of the studied SCS combined or isolated, cultured in RPMI-1640 medium for 48 h [1]. Following this period, the biofilms were collected, the biomass was determined [9] and soluble and insoluble extracellular polysaccharides were assessed [10]. The polysaccharide analysis was expressed as total extracellular polysaccharides (tEPS) by adding the values of soluble plus insoluble extracellular polysaccharides. Data were expressed as a mean and standard deviation, and group comparison was performed by Student T-test or ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. Graph Pad Prism version 5.0 was used for data analysis and a 95% confidence value was considered.

Results and Discussion

Our results showed no difference in *S. mutans* biomass when in contact with both SCS tested (Figure 1a). However, there was an increase in *C. albicans* biomass in the presence of its own SCS

ANEXO D – TERMO DE DOAÇÃO DAS CEPAS CONTROLE

Commercial Invoice
(コマーシャル・インボイス)

Page 1 of 1
(ページ) 1 of 1

This invoice must be completed in English.
(必ず英文で記入してください。)

EXPORTER (輸出者): Tax ID# (納税者番号): Contact Name (担当者名): Kazuhiko Nakano Telephone No. (電話番号): 81998792963 E-Mail (Eメール): nakano@dent.osaka-u.ac.jp Company Name/Address (会社名/住所): Osaka University 1-8 Yamada-oka Suita, Osaka 5650871 Country (国): JAPAN		Ship Date (出荷日): 26 Aug. 2019 Air Waybill No. / Tracking No. (航空貨物運送仕番号/追跡番号): 776074320934 Invoice No. (インボイス番号): Purchase Order (発注書番号): Payment Terms (支払い条件): Bill of Lading (船荷証券): Purpose of Shipment (出荷の目的): GIFT						
Parties to Transaction (取引先): <input type="checkbox"/> Related (関連会社) <input checked="" type="checkbox"/> Non-Related (非関連会社)		CONSIGNEE (荷受人): Tax ID# (納税者番号): Contact Name (担当者名): Dr. Lidiany Karla Azevedo Rodrig Telephone No. (電話番号): 558533668292 E-Mail (Eメール): lidianykarla@ufc.br Company Name/Address (会社名/住所): Universidade Federal do Ceara Faculdade de Farmacia, Odontologia Rua Monsenhor Furtado 394- PORTALEZA CE 60430 Country (国): BRAZIL						
SOLD TO (if different from Consignee) <input checked="" type="checkbox"/> Same as CONSIGNEE (荷受人と同じ): Tax ID# (納税者番号): Company Name/Address (会社名/住所): Country (国): BRAZIL								
If there is a designated broker for this shipment, please provide contact information (この貨物に指定の通関業者がある場合は、連絡先を記入してください。) Name of Broker (通関業者名): Tel. No (電話番号): Contact Name (担当者名):								
Duties and Taxes Payable by (関税と税金の支払者): <input type="checkbox"/> Exporter (輸出者) <input checked="" type="checkbox"/> Consignee (荷受人) <input type="checkbox"/> Other (その他) If Other, please specify (その他の情報があれば記入してください。):								
No. of Packages (パッケージ数)	No. of Units (単位数)	Net Weight (LBS/KGS) (正味重量 (kg/ポンド))	Unit of Measure (数量単位)	Description of Goods (品名の説明)	Harmonized Tariff Number (税関品目番号 (6桁コード))	Country of Manufacture (製造国)	Unit Value (単価)	Total Value (合計金額)
1	2.00	0.20	PCS	Non-pathogenic Oral Bacteria		JP	500.000000	1,000.00
Total Pkgs (パッケージの合計数):	Total Units (ユニット数の合計):	Total Net Weight (正味重量合計):	(Indicate LBS/KGS) (kg/ポンドの単位):	Total Gross Weight (総重量合計):	(Indicate LBS/KGS) (kg/ポンドの単位):	Terms of Sale (貿易取引条件):		Subtotal (小計):
1	2.00	0.20	KG	0.20	KG			1,000.00
Special Instructions (特記事項):							Freight (運送料金):	0.00
Declaration Statement(s) (申告書):							Packing (梱包):	0.00
I declare that all the information contained in this invoice to be true and correct (このインボイスに書かれたことはすべて正確であり、真実であることを宣言します。)							Handling (取り扱い):	0.00
Originator or Name of Company Representative if the invoice is being completed on behalf of a company or individual (申告者または企業の担当者の名前(企業または個人に代わってインボイスの手続きをしている場合): Kazuhiko Nakano							Other (その他):	0.00
Signature / Title / Date (署名/役職/日付):							Invoice Total (インボイス合計):	1,000.00
							Currency Code (通貨コード):	JYE
							26 Aug. 2019	

REV. 02.28.12-1.07

ANEXO E – PERMISSÃO DE REPUBLICAÇÃO DA FIGURA 2

Order Number: 1013692

Order Date: 15 Jan 2020

Payment Information

Francisco Rocha
rulio@ufc.br

Payment method: Invoice

Billing Address:

Prof Francisco Rocha
Avenue of University
Fortaleza - Ce
Brazil

+55 (85)9999314953
rulio@ufc.br

Customer Location:

Prof Francisco Rocha
Avenue of University
Fortaleza - Ce
Brazil

Order Details

1. Future microbiology

Billing Status:
Open

Article: Serotype classification of Streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity

Order license ID 1013692-1

Order detail status Completed

ISSN 1746-0913

Type of use Republish in a thesis/dissertation

Publisher FUTURE MEDICINE LTD

Portion Chart/graph/table/figure

0.00 USD
Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Future microbiology	Publication Type	Journal
Article Title	Serotype classification of Streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity	Start Page	891
		End Page	902
		Issue	7
		Volume	4
Date	01/01/2006		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Rightsholder	Future Medicine Ltd.		